



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**EXPERIMENTALES**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE**  
**LA SALUD**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DE LOS DETERMINANTES  
GENÉTICOS DE RESISTENCIAS A BIOCIDAS  
Y SU PAPEL EN LA RESISTENCIA CRUZADA  
CON ANTIBIÓTICOS EN BACTERIAS DE  
ORIGEN ALIMENTARIO**

**PRESENTADA POR:**  
**MARIA LEYRE LAVILLA LERMA**

**DIRIGIDA POR:**  
**DR. D. HIKMATE ABRIOUEL HAYANI**  
**DR. D. NABIL BENOMAR EL BAKALI**  
**DR. D. ANTONIO GÁLVEZ DEL POSTIGO RUIZ**

**JAÉN, 7 DE NOVIEMBRE DE 2014**

**ISBN 978-84-8439-956-8**

# Estudio de los determinantes genéticos de resistencias a biocidas y su papel en la resistencia cruzada con antibióticos en bacterias de origen alimentario



Memoria para optar al grado de Doctor

María Leyre Lavilla Lerma

Área de Microbiología  
Dpto. de Ciencias de la Salud  
Facultad de Ciencias Experimentales  
Universidad de Jaén

2014

Estudio de los determinantes genéticos de resistencias  
a biocidas y su papel en la resistencia cruzada con  
antibióticos en bacterias de origen alimentario

*Study of genetic determinants of resistance to biocides and their  
role in the cross resistance to antibiotics in foodborne bacteria*

Memoria para optar al grado de Doctor

Jaén, 2014

Fdo: María Leyre Lavilla Lerma

Aspirante al Grado de Doctor

*Los Directores del trabajo:*

*Fdo: Nabil Benomar El Bakali*

*Fdo: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz*

*Fdo: Hikmate Abriouel Hayani*

*Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud  
Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén*

Los profesores D<sup>a</sup> Hikmate Abriouel Hayani, D Nabil Benomar El Bakali y D. Antonio Gálvez del Postigo Ruiz, pertenecientes al Área de Microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral: “Estudio de los determinantes genéticos de resistencias a biocidas y su papel en la resistencia cruzada con antibióticos en bacterias de origen alimentario” presentado por D<sup>a</sup>. María Leyre Lavilla Lerma ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión, cumpliendo así mismo todas las exigencias para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor en la modalidad de Doctorado con Mención Internacional. Parte del trabajo presentado ha sido realizado durante la estancia de la doctoranda en el “Department of Civil and Environmental Engineering” de la Universidad de Strathclyde (Glasgow), por un periodo de tres meses.

Jaén, Septiembre de 2014

Fdo: Nabil Benomar El Bakali

Fdo: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz

Fdo: Hikmate Abriouel Hayani

*Este trabajo ha sido subvencionado por el MICINN (proyecto AGL2009-08921), la junta de Andalucía (P08-AGR-4295, ayudas a grupos de investigación “grupo AGR230”) y el Plan de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén. La doctoranda ha disfrutado de una beca de formación de personal investigador (MICINN) así como de una ayuda de movilidad en programas de doctorado con mención hacia la excelencia para la realización de estancias en otros centros de I+D (FPI).*



INDICE

Summary .....	1
Introducción .....	6
1.- La producción de alimentos .....	7
1.1.- La transformación de los alimentos.....	7
1.2.- El procesado de los alimentos .....	9
1.3.- Los microorganismos en los alimentos.....	9
2.- Los microorganismos relevantes en los alimentos .....	9
<i>Pseudomonas</i> .....	19
Las bacterias del ácido láctico .....	20
<i>Enterococcus</i> .....	21
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
<i>Bacillus</i> .....	23
<i>Escherichia coli</i> .....	24
<i>Listeria</i> .....	25
3.- Los agentes antimicrobianos .....	26
3.1.- Biocidas .....	26
3.2.- Los antibióticos.....	49
4.- La resistencia bacteriana en la cadena de producción de alimentos.....	74
4.1.- La vigilancia .....	76
4.2.- Medidas para asegurar el buen uso de los antibióticos.....	76
4.3.- Reducir el uso de antibióticos en la ganadería. ....	77
Objetivos.....	81
Trabajo experimental y resultados .....	84
Capítulo I: Incidencia de resistencias a antibióticos y/ o biocidas en bacterias aisladas de la cadena de producción de la carne .....	85
Aportación 1.- Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. International Journal of Food Microbiology 161: 97–106. ....	86
Aportación 2.- Diversity, distribution and quantification of antibiotic resistance genes in goat and lamb slaughterhouse surfaces and end products. Enviado a Plos one. ....	97
Capítulo II.- Incidencia de resistencias a antibióticos y/o biocidas en <i>Pseudomonas</i> aisladas de la cadena de producción de la carne .....	132
Aportación 1.- Antibiotic multiresistance analysis of mesophilic and psychrotrophic <i>Pseudomonas</i> spp. Isolated from goat and lamb slaughterhouse surfaces throughout the meat production process. Applied and Environmental Microbiology 80 (21). En prensa. ....	133

Aportación 2.- Correlation between antibiotic and biocide resistance in mesophilic and psychrotrophic <i>Pseudomonas</i> sp. isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production. En preparación.....	173
Capítulo III.- Incidencia de resistencias a antibióticos y biocidas en Enterococos aislados de productos tradicionales fermentados. ....	202
Aportación 1.- Phenotypic and Molecular Antibiotic Resistance Profile of <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Enterococcus faecium</i> Isolated from Different Traditional Fermented Foods. <i>FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE</i> 10: 143-149. ....	203
Aportación 2.- Role of EfrAB efflux pump in biocide tolerance and antibiotic resistance of <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Enterococcus faecium</i> isolated from traditional fermented foods and the effect of EDTA as EfrAB inhibitor. <i>Food Microbiology</i> 44: 249-257.....	211
Discusión General .....	221
Conclusiones .....	245
Concluding Remarks.....	248
Referencias .....	251

SUMMARY

In recent years, the extensive and inappropriate use of antimicrobial agents in human, veterinary, domestic and as disinfectants in food industry may generate a selective pressure for emergence of multiple drug resistant (MDR) bacteria. Nowadays, antibiotic resistance has become a significant and increasing public health problem all over the world especially in developed countries which lead to treatment failure and increased morbidity, mortality, length of hospitalisation and cost of healthcare. Dissemination of resistant bacteria and resistance genes to spread from different sources to humans and also to the environment may have a tremendous impact. Furthermore, the increasing use of biocides in food industry and sanitary may lead to emergence of cross-resistance between biocides and antibiotics considering the commonality target of both antimicrobials. In order to investigate the prevalence of foodborne resistant bacteria to biocides and antibiotics throughout meat chain production from sacrifice till end production line, samples from various surfaces of a goat and lamb slaughterhouse representative of the region were analyzed by culture dependent and independent approaches. Concerning culture dependent analysis, resistant psychrotrophs (n= 255 strains), *Pseudomonas* sp. (n= 166 strains), *Escherichia coli* (n=23 strains), *Staphylococcus* sp. (n= 17 strains) and LAB (n= 82 strains, especially represented by *Lactobacillus* sp.) were isolated from 32 surfaces and 5 meat products of a representative slaughterhouse. Resistant psychrotrophs and pseudomonads (47 and 29%, respectively) to different antimicrobials were frequently detected in almost all areas of meat processing plant regardless the antimicrobial used. Principal component analysis (PCA) determined that quaternary ammonium compounds and hexadecylpyridinium were the most relevant biocides for resistance in *Pseudomonas* sp., while ciprofloxacin and hexachlorophene were more relevant for psychrotrophs, LAB, and in lesser extent *Staphylococcus* sp. and *Escherichia coli*. On the other hand, PCA of sampling zones determined that sacrifice room (SR) and cutting room (CR) considered as main source of antibiotic and/or biocide resistant bacteria showed an opposite behavior concerning relevance of antimicrobials to determine resistance being hexadecylpyridinium, cetrимide and chlorhexidine the most relevant in CR, while hexachlorophene, oxonia 6P and PHMG the most relevant in SR. Those results suggest that rotational use of the relevant biocides as disinfectants in CR and SR is recommended in an environment which is frequently disinfected. Regarding the culture independent approach used to quantitatively track the frequency and the distribution of

antibiotic resistance genes (ARG) in different slaughterhouse surfaces throughout meat chain production (and in the end products) by quantitative real-time PCR revealed a high prevalence of tetracycline resistance genes *tetA* and *tetB* in almost all slaughterhouse zones and that sulfonamide resistance genes were largely distributed, while beta-lactam resistance genes were less predominant. Statistical analysis revealed that resistant bacteria, in most cases, were spread by the same route in almost all slaughterhouse zones, except for *tetB*, *bla<sub>CTX</sub>* and *bla<sub>TEM</sub>* genes, which occurred in few zones as isolated ‘hot spots.’ The sum of all analyzed ARG indicated that slaughterhouse surfaces act as reservoirs of ARG, mainly *tet* genes, which were more prevalent in sacrifice room (SR), cutting room (CR) and meat products (MP). Resistance gene patterns suggest they were disseminated throughout slaughterhouse zones, with significant correlations between different sampling zones and total resistance in SR, CR and white room (WR) zones, and also refrigerator 4 (F4) and MP were observed. Strategically controlling key zones in slaughterhouse (SR, CR and WR) by adequate disinfection methods could strategically reduce the risks of ARG transmission and minimize the issues of food safety and environment contamination. Those results corroborated the previous studies done with culture dependent method.

Considering the high prevalence of pseudomonads in goat and lamb slaughterhouse surfaces throughout meat chain production, we investigated their phenotypic and genotypic antibiotic resistance profiles. Mesophilic (85 isolates) and psychrotrophic (37 isolates) pseudomonads generally were resistant to sulfamethoxazole, erythromycin, amoxicillin, ampicillin, chloramphenicol, trimethoprim, rifampin, and ceftazidime (especially mesophiles), as well as colistin and tetracycline (especially psychrotrophs). However, they generally were sensitive to ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, and kanamycin regardless of species identity. Worryingly, in the present study, we found multidrug resistance (MDR) to up to 13 antibiotics, which was related to intrinsic and acquired resistance mechanisms. Furthermore, a link between various antimicrobial resistance genes was shown for beta-lactams and tetracycline, trimethoprim, and sulfonamides. The distribution and resistome based analysis of MDR pseudomonads in different slaughterhouse zones indicated that the main sources of the identical or related pseudomonad strains were probably the animals (feet and wool) and the slaughterhouse environment, being disseminated from the beginning (entrance environment) to the end. Those facts must be taken into consideration to avoid cross-contamination with the

subsequent flow of mobile resistance determinants throughout all slaughterhouse zones and then to humans and the environment by the application of adequate practices of hygiene and disinfection measures, including those for animal wool and feet and also the entrance environment.

On the other hand, considering the high value of fermented foods consumed all over the world, we investigated the incidence of antibiotic and biocide resistance in enterococci isolated from different fermented foods of animal and vegetable origins. The dualistic aspects of enterococci as nosocomial pathogen and also as starter cultures/probiotics may pose a great challenge concerning their presence in food products especially those of animal origin where they act as potential reservoirs of antibiotic resistance determinants to be spread to humans via various routes. In the present study, a collection of 55 enterococci (41 *Enterococcus faecium* and 14 *E. faecalis* strains) showed lower incidence of resistance to gentamicin, ampicillin, penicillin and teicoplanin. However, a high incidence of antibiotic resistance was detected for rifampicin (12 out of 14 of isolates), ciprofloxacin (9/14), and quinupristin/dalfopristin (8/14) in *E. faecalis* strains. *Enterococcus faecium* isolates were resistant to rifampicin (25/41), ciprofloxacin (23/41), erythromycin (18/41), levofloxacin (16/41), and nitrofurantoin (15/41). One *Enterococcus faecalis* and two *E. faecium* strains were resistant to vancomycin (MIC > 16 µg/mL). Among 55 isolates, 27 (19 *E. faecium* and eight *E. faecalis*) were resistant to at least three antibiotics. High level of multidrug resistance to clinically important antibiotics was detected in *E. faecalis* strains (57% of *E. faecalis* versus 46% of *E. faecium*), which showed resistance to six to seven antibiotics, especially those isolated from foods of animal origin. So, it is necessary to re-evaluate the use of therapeutic antibiotics in stock farms at both regional and international levels due to the high number of MDR bacteria. Fifty six MDR *E. faecalis* and *E. faecium* strains selected from this and previous studies (Valenzuela *et al.*, 2008, 2010) showed the presence of *tet(L)*, *tet(M)*, *ermB*, *cat*, *efrA*, *efrB*, *mphA*, *msrA/B* or *efrA/B* antibiotic resistance genes. Furthermore, MDR enterococci isolated from different fermented foods of animal and vegetable origins were also evaluated for tolerance to various biocides used in food industry. The results obtained showed a reduced susceptibility to biocides which was intra and inter-species dependent and was due to specific and unspecific mechanisms such as efflux pumps. EfrAB, a heterodimeric ABC transporter efflux pump, was detected in MDR *E. faecalis* (100%)

and for the first time in MDR *E. faecium* (12%). The expression of EfrAB was induced by half of minimum inhibitory concentration (MIC) of gentamicin, streptomycin and chloramphenicol. However, expression of *efrA* and *efrB* genes coding for EfrAB was highly dependent on the strain tested and on the antimicrobial used. Our results indicated that 3 mM EDTA highly reduced the MICs of almost all drugs tested. Nevertheless, the higher reductions (>8 folds) were obtained with gentamicin, streptomycin, chlorhexidine and triclosan. Reductions of MICs were correlated with down-regulation of EfrAB expression (10-140 folds) in all three MDR enterococci strains. This is the first report describing the role of EfrAB in the efflux of antibiotics and biocides which reflect also the importance of EfrAB in multidrug resistance in enterococci. EDTA used at low concentration as food preservative could be one of the best choices to prevent spread of MDR enterococci throughout food chain by decreasing EfrAB expression. EfrAB could be an attractive target not only in enterococci present in food matrix but also those causing infections as well by using EDTA as therapeutic agent in combination with low doses of antibiotics.



## INTRODUCCIÓN

## **1.- La producción de alimentos**

A efectos del Reglamento CE 178/2002, se entenderá por «alimento» o «producto alimenticio» cualquier sustancia o producto destinado a ser ingeridos por los seres humanos o con probabilidad razonable de serlo, tanto si ha sido transformado entera o parcialmente como si no. Alimento incluye las bebidas, la goma de mascar y cualquier sustancia, incluida el agua, incorporada voluntariamente durante su fabricación, preparación o tratamiento.

### **1.1.- La transformación de los alimentos**

Los seres humanos somos los únicos del reino animal que cosechamos, almacenamos y procesamos los alimentos que cultivamos, a diferencia del resto de los animales, quienes cazan sus alimentos pero no los procesan. A lo largo de la evolución, el hombre ha aprendido a cultivar los alimentos y, posteriormente, ha desarrollado diversas técnicas de transformación y conservación para aumentar las características deseables de éstos (Latham, 2002; Fellows, 2005). Así tras el procesado, los alimentos se vuelven mucho más sabrosos, e incluso en algunos casos, el procesado elimina sustancias tóxicas, como ocurre con el cocinado de algunas legumbres. No debemos olvidar, que el procesado también deriva en técnicas que retardan o incluso detienen el proceso natural del deterioro. Es por ello, que ya sea por resultar más atractivos, gustativamente hablando, o por cuestiones sanitarias, los alimentos se transforman antes de su consumo, lo que ha derivado en la gran diversidad de técnicas actuales (Fellows, 2005).

Se diferencian dos categorías de elaboración y transformación de los alimentos (Fellows, 2005):

- La elaboración primaria, que sirve para estabilizar los alimentos tras la recolección e incluso mejorar su almacenamiento. Aquí podríamos referirnos al secado de granos, la molienda de cereales o la extracción de aceites de semillas, entre otros.
- La elaboración secundaria, donde los alimentos frescos o los procedentes de la elaboración primaria, son transformados en una amplia gama de productos derivados.

Todos los alimentos transformados deben garantizar la inocuidad para el consumidor, ya sea en lo referido a los riesgos biológicos (presencia de gusanos, parásitos, hongos productores de micotoxinas, bacterias patógenas, virus, etc.),

químicos (trazas de pesticidas, productos de limpieza, drogas veterinarias, sustancias que migran del envase, etc.) o físicos (trozos o esquirlas de vidrio, metal, piedras, plásticos, etc.) (Fellows, 2005).

En lo referido a la contaminación por microorganismos, el origen suele presentarse en la contaminación de la materia prima, el inadecuado control de la temperatura durante el cocinado, refrigerado y almacenamiento, la contaminación cruzada entre productos frescos y crudos, la higiene personal deficiente y la mala manipulación de los alimentos (Tabla 1). Según la Organización Mundial de la Salud, la contaminación microbiana es el mayor riesgo para la seguridad alimentaria en la actualidad, y el número de afectados por alimentos contaminados por agentes biológicos aumenta cada año (Fellows, 2005).

**Tabla 1.- Causas de contaminación final del alimento.**

(<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/foodbornezoonoticdiseases.htm?wtrl=01>)

En el campo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La comida del animal puede estar contaminada con bacterias que causan infección al animal y puede provocar también infección al hombre desde los productos derivados.</li> <li>- Los parásitos pueden infectar a los animales.</li> <li>- La leche puede contaminarse al entrar en contacto por ejemplo con heces o polvo ambiental.</li> <li>- La piel del animal puede contaminarse por heces.</li> <li>- Los huevos y vegetales pueden contaminarse en el campo.</li> </ul>
En el matadero	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La carne puede contaminarse al entrar en contacto con contenido intestinal o piel</li> </ul>
Durante el procesamiento posterior	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Los microorganismos presentes en otros productos crudos o en las superficies pueden contaminar el alimento.</li> <li>- Las manos contaminadas de los manipuladores pueden contaminar el alimento.</li> </ul>
En la cocina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Las bacterias pueden transferirse de un alimento a otro, mediante utensilios o las propias manos.</li> </ul>

La manipulación segura de la carne y otros productos crudos, mediante el cocinado adecuado y la correcta higiene en la cocina, previenen y reducen el riesgo de estos microorganismos (página web de European Food Safety Authority).

## 1.2.- El procesamiento de los alimentos

En la elaboración de cualquier alimento, éste se somete a una combinación de manipulaciones con objeto de conseguir determinadas cualidades.

El procesamiento de los alimentos pasa por distintas fases, desde la preparación de la materia prima, con el lavado, clasificación y pelado, hasta otro tipo de etapas como son la reducción de tamaño, el mezclado y moldeo, la separación y concentración de componentes, los tratamientos térmicos u otras tecnologías más avanzadas como la fermentación, la irradiación, los campos eléctricos, las altas presiones hidrostáticas, los pulsos de luz o los ultrasonidos.

## 1.3.- Los microorganismos en los alimentos

### 1.3.1 La carne y los productos cárnicos

#### LA CARNE

La contaminación depende del tipo de producto, su composición, y las condiciones ambientales, aunque no siempre estar contaminado implica que el alimento sea no seguro. La carne se considera como contaminada cuando es considerada inaceptable según sus características organolépticas: aparición de olores o sabores desagradables, aparición de mucosidad, decoloración o cualquier otra característica que le hace inaceptable para el consumidor (Doyle y Beuchat, 2007).

Se considera que los tejidos musculares de los animales sanos están libres de bacterias en animales sanos (Jay *et al.*, 2005; Doyle y Beuchat, 2007); sin embargo, las barreras protectoras y las defensas naturales del animal son destruidas en el matadero, lo que contribuye a que la carne se exponga a fuentes de contaminación y que la descomposición microbiana tenga lugar. Así, a menos que el proceso se controle, la contaminación se extiende con microorganismos procedentes de las distintas superficies del animal, especialmente del tracto gastrointestinal así como de las distintas superficies del matadero (Doyle y Beuchat, 2007) (Tabla 2).

Los organismos más importantes que contribuyen a la contaminación de la carne son: bacterias de la Familia *Enterobacteriaceae*, *Photobacterium phosphoreum*, *Shewanella putrefaciens*, *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. y bacterias del ácido láctico (Doyle y Beuchat, 2007). Sin embargo, aunque la carne puede contaminarse con una gran cantidad de microorganismos, su deterioro lo producen sólo unos pocos de éstos, al convertirse en los microorganismos dominantes mediante una selección que se da durante el almacenamiento y que es debida al desarrollo de asociaciones microbianas. Así, la temperatura y la composición de gases durante el almacenamiento, además de la competición por los nutrientes, la

adaptación al ambiente, y la comunicación entre las células (por ej, *quorum sensing*) serán los principales determinantes en el crecimiento de unos determinados microorganismos con unas determinadas consecuencias sobre el deterioro (Doyle y Beuchat, 2007).

**Tabla 2.- Fuentes de contaminación (Doyle y Beuchat, 2007).**

Fuente de contaminación	Fuente de contaminación de:			
	Carne roja	Aves de corral	Pescado	Marisco
Pelo y piel	X			
Piel, plumas, patas		X		
Pezuñas	X			
Método de captura			X	X
Recipiente			X	X
Hielo o agua del mar			X	X
Redes y manejo			X	
Medio ambiente marino			X	X
Tracto gastrointestinal	X	X	X	
Piel (contacto con aerosoles)	X	X		
Hígado y heces	X	X		
Escaldado	X	X		
Maquinaria de depilado	X			
Maquinaria de desplumado		X		
Chamuscado	X			
Evisceración	X	X	X	
Procesamiento de la carne	X	X	X	X
Resto de ingredientes	X	X	X	X

En las carnes frescas, incluidas las aves de corral, el pescado y el marisco, el pH se sitúa dentro del rango de crecimiento de la mayoría de los microorganismos, y existen nutrientes en cantidades adecuadas para tal fin, lo que hace que puedan desarrollarse más de 25 géneros bacterianos distintos (Tabla 3); sin embargo, cuando la temperatura desciende debido a la refrigeración, el organismo alterante más importante pertenece al género *Pseudomonas*. A su vez, se promueve la inhibición de los hongos, debido a que éstos crecen mucho más despacio que las bacterias, quienes consumen el oxígeno disponible de las superficies, imposibilitando el desarrollo de los hongos (Doyle y Beuchat, 2007).

**Tabla 3.- Géneros bacterianos más frecuentemente aislados en carnes frescas y aves de corral (Modificado de Jay *et al.*, 2005).**

Género	Tinción Gram	Carne fresca	Aves de corral
<i>Acinetobacter</i>	-	XX	XX
<i>Aeromonas</i>	-	XX	X
<i>Alcaligenes</i>	-	X	X
<i>Arcobacter</i>	-	X	
<i>Bacillus</i>	+	X	X
<i>Brochothrix</i>	+	X	X
<i>Campylobacter</i>	-		XX
<i>Carnobacterium</i>	+	X	
<i>Caseobacter</i>	+	X	
<i>Citrobacter</i>	-	X	X
<i>Clostridium</i>	+	X	X
<i>Corynebacterium</i>	+	X	XX
<i>Enterobacter</i>	-	X	X
<i>Enterococcus</i>	+	XX	X
<i>Erysipelothrix</i>	+	X	X
<i>Escherichia</i>	-	X	
<i>Flavobacterium</i>		X	X
<i>Hafnia</i>	+	X	
<i>Kocuria</i>	+	X	X
<i>Kurthia</i>	+	X	
<i>Lactobacillus</i>	+	X	
<i>Lactococcus</i>	+	X	
<i>Leuconostoc</i>	+	X	
<i>Listeria</i>	+	X	XX
<i>Microbacterium</i>	+	X	X
<i>Micrococcus</i>	+	X	XX
<i>Moraxella</i>	-	XX	X
<i>Paenibacillus</i>	+	X	X
<i>Pantoea</i>	-	X	X
<i>Pediococcus</i>	+	X	
<i>Proteus</i>	-	X	X
<i>Pseudomonas</i>	-	XX	XX
<i>Psychrobacter</i>	-	XX	X
<i>Salmonella</i>	-	X	X
<i>Serratia</i>	-	X	X
<i>Shewanella</i>	-	X	
<i>Staphylococcus</i>	+	X	X
<i>Vagococcus</i>	+		XX
<i>Weisella</i>	+	X	
<i>Yersinia</i>	-	X	

X: aislados frecuentemente  
XX: aislados muy frecuentemente

## LOS PRODUCTOS CÁRNICOS

Además de la carne en sí, a los productos cárnicos se les adicionan otros muchos ingredientes, como especias o condimentos, que pueden contener una alta carga microbiana. A su vez, estos productos se fabrican con partes del animal que han

estado en contacto con contenido intestinal o con partes que no han recibido el cuidado necesario durante el procesado (patas, orejas, etc.).

El deterioro se caracteriza principalmente por tres tipos: aparición de moco, amargor y coloración verdosa. El moco se desarrolla por el efecto de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Brochothrix thermosphacta*; el amargor suele desarrollarse en la superficie del producto, debido al crecimiento de lactobacilos, enterococos y *B. thermosphacta* al metabolizar la lactosa y otros azúcares y producir ácidos orgánicos; en contraste, la coloración verdosa puede deberse a la producción de sulfuro de hidrógeno y peróxido de hidrógeno por determinadas bacterias (Tabla 4) (Jay *et al.*, 2005).

**Tabla 4.- Géneros bacterianos más frecuentemente aislados en productos cárnicos (Jay *et al.*, 2005).**

Género	Tinción Gram	Prevalencia
<i>Acinetobacter</i>	-	X
<i>Aeromonas</i>	-	X
<i>Alcaligenes</i>	-	X
<i>Bacillus</i>	+	X
<i>Brochothrix</i>	+	X
<i>Carnimonas</i>	-	X
<i>Carnobacterium</i>	+	X
<i>Clostridium</i>	+	XX
<i>Corynebacterium</i>	+	X
<i>Enterobacter</i>	-	X
<i>Enterococcus</i>	+	X
<i>Hafnia</i>	+	X
<i>Kocuria</i>	+	X
<i>Kurthia</i>	+	X
<i>Lactobacillus</i>	+	XX
<i>Lactococcus</i>	+	X
<i>Leuconostoc</i>	+	X
<i>Listeria</i>	+	X
<i>Macrococcus</i>	+	X
<i>Microbacterium</i>	+	X
<i>Micrococcus</i>	+	X
<i>Moraxella</i>	-	X
<i>Paenibacillus</i>	+	X
<i>Pediococcus</i>	+	X
<i>Pseudomonas</i>	-	XX
<i>Serratia</i>	-	X
<i>Shewanella</i>	-	X
<i>Staphylococcus</i>	+	X
<i>Vibro</i>	-	X
<i>Weisella</i>	+	X
<i>Yersinia</i>	-	X
X: aislados frecuentemente		
XX: aislados muy frecuentemente		

Las diferencias entre la carne fresca y los productos cárnicos es que las bacterias Gram-negativas que se desarrollan en la primera, no son capaces de proliferar al pH y baja  $a_w$  de los productos cárnicos (Jay *et al.*, 2005). Así, en productos como el bacon, con gran cantidad de grasas y baja  $a_w$ , los hongos son los microorganismos que más suelen desarrollarse, aunque también pueden hacerlo bacterias del género *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Micrococcus* (Jay *et al.*, 2005).

La refrigeración también limita el deterioro de los productos curados, aunque ésta no impide el desarrollo de *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Micrococcus* y *Clostridium* (Jay *et al.*, 2005).

Para finalizar, en los productos cárnicos cocidos, el tratamiento térmico resulta en la destrucción de las células vegetativas y la permanencia de las esporas bacterianas, lo que implica que la manipulación post-tratamiento y la conservación a temperaturas inadecuadas, sean la principal fuente de contaminación (Jay *et al.*, 2005; Doyle y Beuchat, 2007).

### 1.3.2 Los pescados y mariscos

La población microbiana en pescados y mariscos viene determinada por el agua de donde han sido pescados. Como en el caso de los productos cárnicos, los tejidos de los peces sanos son estériles, aunque debe prestarse especial atención a las agallas, el limo exterior y los intestinos (Jay *et al.*, 2005).

Tanto los peces de agua dulce como salada, poseen elevadas concentraciones de proteínas y otros compuestos del nitrógeno, nulas concentraciones de carbohidratos y cantidad de grasas variables según especies, lo que determina la contaminación que pueden sufrir (Jay *et al.*, 2005).

En los peces de agua caliente, la población microbiana suele estar caracterizada por bacterias Gram-positivas mesófilas, mientras que en los peces de agua fría, suelen predominar las bacterias Gram-negativas (Jay *et al.*, 2005) (Tabla 5). La microbiota de los peces contaminados suele presentarse con bacterias Gram-negativas como *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, quienes pueden crecer a temperaturas entre 0 y 1°C; así tenemos como *Pseudomonas* spp. es capaz de causar contaminación del pescado a 3°C, aunque a ritmo muy lento (Jay *et al.*, 2005). Destacar que las zonas más susceptibles a la contaminación son las agallas, y que debe prestarse especial atención a la evisceración, puesto que rápidamente tras la



pesca, las bacterias intestinales comienzan su camino a través de la pared intestinal, gracias a la presencia de las enzimas proteolíticas del intestino (Jay *et al.*, 2005).

**Tabla 5.- Géneros bacterianos más frecuentemente aislados en productos de la pesca, marisco y pescado (Jay *et al.*, 2005).**

Género	Tinción Gram	Prevalencia
<i>Acinetobacter</i>	-	X
<i>Aeromonas</i>	-	XX
<i>Alcaligenes</i>	-	X
<i>Bacillus</i>	+	X
<i>Corynebacterium</i>	+	X
<i>Enterobacter</i>	-	X
<i>Enterococcus</i>	+	X
<i>Escherichia</i>	-	X
<i>Flavobacterium</i>	-	X
<i>Lactobacillus</i>	+	X
<i>Listeria</i>	+	X
<i>Microbacterium</i>	+	X
<i>Moraxella</i>	-	X
<i>Photobacterium</i>	-	X
<i>Pseudoalteromonas</i>	-	X
<i>Pseudomonas</i>	-	XX
<i>Psychrobacter</i>	-	XX
<i>Shewanella</i>	-	XX
<i>Vibro</i>	-	X
<i>Weisella</i>	+	X
X: aislados frecuentemente		
XX: aislados muy frecuentemente		

Los mariscos, de la misma manera que como ocurre con los pescados, poseen gran cantidad de compuestos del nitrógeno, como aminoácidos, rápidamente utilizados por los microorganismos alterantes, aunque poseen un poco más de carbohidratos. En cuanto a la contaminación, suele representarse por las mismas bacterias que para los pescados (Jay *et al.*, 2005).

Las alteraciones de los moluscos son algo más variable, al poseer más cantidad de carbohidratos que los anteriores, y al definirse su microbiota dependiendo de la calidad del agua de la cual han sido pescados, aunque podemos destacar: *Serratia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium* y *Micrococcus* (Jay *et al.*, 2005).

### 1.3.3 Los vegetales y las frutas.

#### LOS VEGETALES

La microbiota de los vegetales refleja la de los suelos en los que son cultivados. Los actinomicetos son las bacterias más abundantes en los suelos, pero son raramente aisladas en los productos vegetales; sin embargo, las bacterias del ácido láctico no suelen presentarse en suelos, pero sí en plantas y vegetales. Así, la incidencia de los microorganismos en los vegetales refleja la calidad del procesado y el estado del producto fresco antes de su procesado (Jay *et al.*, 2005).

La composición media del contenido en agua de los vegetales suele rondar el 88%, seguido de 8,6% de carbohidratos, 1,9% de proteínas y 0,3% de grasas. Además, el pH de estos productos se encuentra dentro del rango del crecimiento de las bacterias, lo que en su conjunto convierte a los vegetales en un medio idóneo para el crecimiento tanto de bacterias, como hongos y levaduras (Jay *et al.*, 2005). Los géneros bacterianos más comúnmente aislados en el campo y durante el almacenamiento son *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, *Erwinia* y *Xanthomonas* (Jay *et al.*, 2005).

El mecanismo del deterioro en los vegetales comienza cuando las pectinasas de los microorganismos productores actúan hidrolizando la pectina, lo que provoca el ablandamiento de la consistencia del vegetal. Una vez se ha destruido la barrera externa de la planta por las pectinasas, los microorganismos no productores de pectinasas entran a los tejidos de las plantas y ayudan a ejercer la fermentación de los carbohidratos simples (Jay *et al.*, 2005). Además, las cantidades de compuestos simples del nitrógeno, las vitaminas y los minerales son también idóneos para facilitar el desarrollo de los microorganismos.

#### LAS FRUTAS

En las frutas, el contenido en agua es del 85% y en carbohidratos del 13%, lo que las diferencia de los vegetales en una menor concentración de agua pero mayor en carbohidratos.

A primera vista, parece ser que estos productos poseen también unas características idóneas para el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras, sin embargo, el pH es algo menor que el adecuado para el desarrollo de las bacterias, lo que explica la ausencia de bacterias en las primeras etapas de la alteración de las frutas (Jay *et al.*, 2005).

### 1.3.4 La leche y los productos lácteos

El procesado de los lácteos incluye la pasteurización, fermentación, deshidratación, refrigeración y congelación. El resultado de éstos, es el desarrollo de una gran cantidad de texturas y sabores, y a su vez una gran variabilidad de microorganismos alterantes.

#### LA LECHE

La leche de vaca posee aproximadamente un 87% de agua, 3,5% de proteínas, 3,9% de grasas y 4,9% de carbohidratos. La proteína de la leche es representada por la caseína, que precipita cuando el pH es menor de 4,6; el carbohidrato más representativo es la lactosa; además, presenta gran cantidad de vitaminas, especialmente las del grupo B. Todo esto hace que la leche sea un excelente medio de cultivo para los microorganismos.

La leche de vacas sanas debería ser libre de microorganismos patógenos, pero lo cierto es que en ella podemos encontrar generalmente recuentos  $<10^3$  UFC/ml. De entre ellos, podemos destacar a *Campylobacter* y *Salmonella*, debido a contaminaciones de la leche cruda con heces; *Listeria* en vacas con mastitis, *Yersinia enterocolitica* e incluso *Y. frederiksenii* en leche pasteurizada; y sobre todo destacar a *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis*, patógeno de rumiantes involucrado en la causa etiológica de la enfermedad de Crohn (Jay *et al.*, 2005). La pasteurización de la leche destruye a la mayoría de los microorganismos, pero no a todos, así vemos como tras un estudio en Reino Unido con 841 muestras de leche, el 11.8% de las muestras pasteurizadas resultaron positivas en *M. avium* subesp. *paratuberculosis* (Jay *et al.*, 2005).

La contaminación de la leche está limitada por la presencia de la lactosa, pues solo un limitado número de microorganismos pueden obtener energía de este azúcar, como son los coliformes. Éstos metabolizan la lactosa rindiendo, entre otras sustancias, ácido láctico y CO<sub>2</sub>, lo que origina un aumento de la acidez de la leche (Ordóñez *et al.*, 1998; Jay *et al.*, 2005). Así, la contaminación de la leche se ve sujeta a una primera transformación de la lactosa en ácido láctico y la consiguiente reducción del pH de 6,6 a 4,5, que provoca la precipitación de las caseínas. Así, *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus*, usa la glucosa de la lactosa y excreta galactosa, utilizada por los microorganismos no consumidores de lactosa (Jay *et al.*, 2005).

Por otro lado, el tratamiento térmico de la leche, como la pasteurización, condiciona el crecimiento de los microorganismos, al destruir diferentes inhibidores del crecimiento, por lo que la contaminación post-pasteurización conlleva a un desarrollo

más rápido de bacterias en la leche pasteurizada que en la cruda. Tratamientos térmicos más severos, provocan la hidrólisis de las proteínas, incrementando la proporción de nitrógeno (Doyle y Beuchat, 2007).

La contaminación de la leche UHT se debe a *Bacillus* spp. que sobrevive al tratamiento térmico: *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. badius*, *B. sporothermodurans* y *Paenibacillus* spp. han sido aislados de la leche UHT. Además, durante el almacenamiento en frío de la leche pasteurizada, puede desarrollarse *B. weihenstephanensis*, causante de la “coagulación dulce” por la producción de proteasas y peptidasas (Jay *et al.*, 2005). El deterioro de la leche UHT viene condicionado por el crecimiento de psicrótrofos en la leche cruda, que producen proteasas y lipasas termo-resistentes. Por otro lado, *Alcaligenes viscolactis* puede producir aumento de la viscosidad de la leche, favorecido por mantener la leche cruda a bajas temperaturas durante varios días (Jay *et al.*, 2005).

#### 1.3.5.- Los productos fermentados

La fermentación consiste en el uso controlado de microorganismos seleccionados, que modifican la textura y promueven el desarrollo de aromas y prolongan su vida útil mediante la producción de ácidos o alcoholes.

Los alimentos fermentados son unos de los alimentos procesados más antiguos y constituyen una parte muy importante de la dieta de la mayoría de los países. El sector de los alimentos fermentados abarca un gran abanico de productos, desde la panadería, bebidas alcohólicas, yogur, queso, productos de soja, etc.

Las principales ventajas de la fermentación son:

- La utilización de pHs y temperaturas que no alteran, sino que incluso mejoran, el valor nutritivo y características organolépticas del alimento.
- Desarrollo de aromas y texturas que no pueden obtenerse con otros procedimientos.
- Bajo consumo energético.
- Gastos de instalación y funcionamiento bajos.
- Tecnología sencilla.

Los principales factores que controlan el crecimiento y la actividad microbiana en las fermentaciones alimentarias son:

- La disponibilidad de carbono y nitrógeno, así como de nutrientes específicos
- El pH del sustrato
- El contenido en agua

- La temperatura de incubación
- El potencial redox
- La fase de crecimiento del microorganismo
- La presencia de microorganismos competidores.

Para finalizar, decir que según el producto final de las fermentaciones, éstas pueden clasificarse en:

- Homofermentativas: cuando los microorganismos producen un solo producto.
- Heterofermentativas: cuando los microorganismos producen una mezcla de productos, como el etanol o dióxido de carbono, entre otros.

En las fermentaciones lácticas, la secuencia en la que las bacterias intervienen viene determinada por su tolerancia al ácido.

La mantequilla o la crema agria, entre otros, son producidas por la inoculación de leche pasteurizada con cultivos iniciadores de bacterias lácticas, lo que aporta los aromas y sabores característicos.

El yogur, producto estrella de los lácteos fermentados, es producido por *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*.

Otros productos lácteos fermentados son el kéfir, el kumis y los quesos. La mayoría de los quesos, pero no todos, resultan de la fermentación de la leche. Existen unas 400 variedades de quesos, representados en unas 20 tipos distintos según la textura y tipo de maduración.

## PRODUCTOS NO LÁCTEOS FERMENTADOS

Existen muchos productos fermentados no lácteos:

- Entre los productos cárnicos fermentados tenemos a las salchichas o los jamones curados.
- Existen también diversos productos de pescado fermentados, consumidos ampliamente en Asia. Los más representativos son las salsas y las pastas de pescado.
- El pan, producto estrella de la dieta.
- De entre los vegetales fermentados, destacar el chucrut (repollo), las aceitunas y los pepinillos.

- La cerveza, cuyo principal paso es la transformación de los azúcares en etanol. El vino, la sidra y las bebidas espirituosas, son también productos fermentados.

## 2.- Los microorganismos relevantes en los alimentos

---

### *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonaceae* que se sitúa dentro del orden *Pseudomonadales*.

La primera descripción de este género data de 1895, por Walter Migula en el *Bacteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe*, en una publicación que llevaba por título “*Ueber ein neues. System der Bakterien*” donde describía y comparaba todas las bacterias conocidas hasta el momento. Esta descripción de *Pseudomonas* estaba basada únicamente en características morfológicas.

#### *Características generales*

*Pseudomonas spp.* es un bacilo Gram-negativo que puede presentar de 1,5 a 5 µm de largo, es aerobio, oxidasa y catalasa positivas y no formador de esporas. Las especies de este género son móviles, debido a la presencia de uno o más flagelos polares. La mayoría de las especies del género no crecen bajo condiciones ácidas, no pueden fermentar la lactosa (aunque pueden degradar la glucosa oxidativamente y convertir el nitrógeno en nitrito y nitrógeno gas) y poseen un metabolismo aerobio estricto con el oxígeno como aceptor final de electrones, aunque algunos aislados pueden crecer lentamente en condiciones anaerobias utilizando el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o la arginina como aceptores finales de electrones. La mayoría de las especies tienen una temperatura de crecimiento de 30-37°C, pero pueden sobrevivir y multiplicarse en casi cualquier ambiente, incluyendo aquellos con elevado contenido en sales y en rangos de temperatura de 20- 42°C.

Tienen la capacidad de producir morfologías coloniales distintivas y pigmentadas. Destacar la capacidad de determinadas especies de sintetizar pigmentos fluorescentes bajo luz ultravioleta de longitud de onda baja (254 nm).

#### Descripción general

*Pseudomonas* es un género de especies capaces de utilizar un amplio rango de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, y de vivir bajo diversas condiciones ambientales. Es por ello que son considerados microorganismos son

muy ubicuos, al poder encontrarse tanto en los ecosistemas terrestres como acuáticos.

El género *Pseudomonas* es bien conocido por su versatilidad metabólica y plasticidad genética. Las especies de *Pseudomonas*, en general, crecen rápidamente y presentan gran capacidad para metabolizar una amplia variedad de sustratos, incluyendo compuestos orgánicos tóxicos. Las cepas de las especies de *Pseudomonas* son frecuentemente resistentes a antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales pesados y solventes orgánicos.

Destacar por su peligrosidad en humanos a *P. aeruginosa*; a *P. syringae* por definirse como patógena de plantas; y a *P. putida* y *P. fluorescens* por su presencia en tierra y plantas; aunque también forman parte de la microbiota de la faringe, la membrana de las mucosas y la piel de los humanos (Prasad y Minakshi, 2007)

Como alterantes, destacar su capacidad de descomponer gran variedad de compuestos dando olores desagradables, debido a su capacidad proteolítica (Nguyen y Carlin, 1994; Riva *et al.*, 2001) en alimentos con gran cantidad de  $a_w$  como carne y queso, lipolítica en productos lácteos y pectinolítica en vegetales mínimamente procesados. Además, por su capacidad psicrótrofa, especialmente referida en *P. fragi*, *P. fluorescens* y *P. putida*, pueden alterar productos refrigerados, como se ha visto en anteriores apartados. Diversos estudios epidemiológicos realizados en hospitales han revelado que los vegetales, las carnes y los alimentos congelados están a veces contaminados con *P. aeruginosa*, y destacar además, que la leche de mujer se ha señalado como una fuente de infección para los niños (Internatonal Commission on Microbiological Specifications for Foods, ICMSF, 2000). La capacidad para sobrevivir en tal variedad de ambientes le permite la fácil diseminación de genes de resistencia por transferencia horizontal desde plásmidos, integrones o transposones (Breidenstein *et al.*, 2011). En este aspecto destacar además, la elevada resistencia observada a antibióticos comúnmente utilizados en la clínica humana como son la ampicilina, amoxicilina, sulfametoxazol, trimetoprim, eritromicina y cloranfenicol (Lavilla- Lerma *et al.*, 2014b)

#### **Las bacterias del ácido láctico**

Las BAL incluyen un amplio grupo filogenéticamente de diversos géneros. Como características generales, las especies de este grupo de bacterias Gram-

positivas presentan morfología cocoidea o bacilar, son catalasa negativas, no esporulantes y anaerobias o aerotolerantes, y pueden producir ácido láctico como producto final de la fermentación de los azúcares. Las bacterias de este grupo, al no poseer porfirinas ni citocromos, no realizan la fosforilación mediante cadena de transporte de electrones, sino mediante la fosforilación a nivel de sustrato: la mayoría obtienen la energía del metabolismo de los azúcares, por lo que sus hábitats suelen presentarse en zonas donde éstos están presentes. Su metabolismo biosintético es muy escaso, por lo que requieren medios de cultivos ricos, con aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas. Fisiológicamente se diferencian dos grupos según los productos finales de la fermentación de los azúcares.

Taxonómicamente, las BAL son un grupo polifilético (Makarova y Koonin, 2007) situado en la subdivisión de eubacterias Gram-positivas de bajo contenido en G+C (< 53 mol% G+C), conocida como subdivisión Clostridial. Comprende más de 20 géneros, entre los que destacan por su asociación con alimentos los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*.

Las BAL se suelen encontrar tanto en suelos, aguas y, sobre todo, asociadas a plantas y animales. Suelen, además, formar parte de la microbiota gastrointestinal y genitourinaria del hombre, donde desempeñan diversas acciones beneficiosas (Klaenhammer *et al.*, 2005). Además, su papel en la producción de alimentos fermentados, conlleva a su elevada presencia en éstos. Sin embargo destacar el papel como patógenas y patógenas oportunistas en hombre y animales, destacando a *Enterococcus* y *Streptococcus*, e incluso de *Lactobacillus* (Gasser, 1994).

### ***Enterococcus***

El género *Enterococcus*, es un grupo de bacterias del ácido láctico, compuesto por cocos Gram- positivos que se presentan en cadenas o en parejas y que presentan un metabolismo anaerobio facultativo. Carecen de catalasa, pero poseen superóxido dismutasa y peroxidasa que eliminan el O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente, que se generan en condiciones de aerobiosis. Catabolizan una gran variedad de fuentes energéticas, como son los carbohidratos, glicerol, lactato, malato, citrato, arginina, agmatina y cetoácidos.



Son capaces de sobrevivir a condiciones ambientales muy adversas, pudiendo crecer a temperaturas entre 10 y 45°C, soportar pHs de 9.6 y elevadas concentraciones de NaCl y sales billares.

Su reservorio natural es el tracto gastrointestinal de los mamíferos, y se excretan por las heces, de ahí que su presencia sea indicadora de contaminación fecal. La presencia de gran número de enterococos en los alimentos, a excepción de cuando se encuentran presentes en alimentos fermentados por cepas específicas, implica prácticas inadecuadas de higiene (International Commission on Microbiological Specifications for Foods ICMSF, 2000).

Se clasifican como patógenos oportunistas, pudiendo causar infecciones urinarias, bacteremia, endocarditis y meningitis. Las especies más representativas son *E. faecalis* y *E. faecium* causantes del 75 y 20% de las infecciones nosocomiales relacionadas con los enterococos (Conde Estévez *et al.*, 2011; Peel *et al.*, 2011)

La característica más importante desde el punto de vista médico, es su alto nivel de resistencia a antibióticos. Algunos de éstos presentan resistencia a los beta- lactámicos, cefalosporinas, aminoglucósidos y glicopéptidos (Murray, 1990; Kacmaz y Aksoy, 2005) aunque también se ha visto una gran tolerancia a los biocidas comúnmente usados como desinfectantes en la industria alimentaria (Lavilla- Lerma *et al.*, 2014),

La mayoría de las especies de enterococos son conocidas por sus implicaciones como patógenos, pero algunas de ellas son utilizadas como iniciadores de las fermentaciones o como probióticos; destacar por ello algunas cepas de *E. faecium*, autorizadas por European Food Safety Authority (EFSA, 2012) como aditivos alimentarios.

### ***Staphylococcus aureus***

El género *Staphylococcus* pertenece al orden *Bacillales* y a la familia *Staphylococcaceae*. Son bacterias Gram-positivas, no esporuladas y con bajo contenido en G+C. Morfológicamente se trata de cocos, que suelen presentarse en agrupaciones con forma de racimo de uva, de tamaño 0.8-1 µm de diámetro. Son microorganismos aerobios o anaerobios facultativas e inmóviles. Destacar la existencia de especies patógenas oportunistas para el hombre y animales.

La especie tipo, *Staphylococcus aureus*, tiene todas las características típicas del género: anaerobio facultativo, mesófilo, necesita aminoácidos y vitaminas para su crecimiento, es capaz de fermentar la glucosa y el manitol con producción de ácido y tolera condiciones ambientales muy variables. Su temperatura y pH de crecimientos óptimos son 30- 37°C, y valores de pH cercanos a la neutralidad. Es tolerante con respecto a la sal, resistiendo concentraciones de hasta un 20% NaCl, lo que le permite desarrollarse en productos con baja  $a_w$ .

Con respecto a *S. aureus* destacar a parte de su propio proceso infeccioso, la capacidad de producir toxinas eméticas en los alimentos. El manejo humano de los productos alimenticios, así como la infección/colonización del ganado constituyen el principal mecanismo para la contaminación de los alimentos con *S. aureus* (Wei y Chiou, 2002; Greig *et al.*, 2007; Normanno *et al.*, 2007; Spanu *et al.*, 2012). La ingesta de alimentos contaminados con *S. aureus* puede causar intoxicaciones severas que incluyen vómitos, gastroenteritis, náuseas, diarrea y dolor abdominal. Estas intoxicaciones se asocian con una gran variedad de productos, incluyendo carne, leche y queso, en los que la bacteria puede crecer y producir enterotoxinas (Wei y Chiou, 2002; Greig *et al.*, 2007; Normanno *et al.*, 2007; Spanu *et al.*, 2012).

### ***Bacillus***

Las especies del grupo *Bacillus* pertenecen al grupo de bacterias de bajo contenido en G+C (De Vos, 2002). Sus células son Gram- positivas de al menos 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y presentan esporas. Son en general, mesófilos, anaerobios facultativos y Voges-Proskauer (VP) positivos (Claus y Berkeley, 1986). *Bacillus cereus* se diferencia del resto de especies del género por la no producción de ácido a partir del manitol, y por la actividad lecitinasas.

*Bacillus cereus* es un microorganismo ubicuo, que se aísla de gran variedad de muestras ambientales (Granum 1997; Kotiranta *et al.*, 2000), y se considera un habitante saprofita del suelo.

Debido a su abundancia y a la resistencia de sus esporas, *B. cereus* es contaminante de prácticamente todos los productos agrícolas y juega un papel importante en la contaminación y alteración de alimentos: arroz, productos lácteos, especias, espaguetis y otros tipos de pasta, alimentos desecados, carne, pollo, vegetales, frutas, semillas y marisco (Granum 1997; Ehling-Schulz

*et al.*, 2004). Es un microorganismo muy difícil de controlar en lo que se refiere a la producción de alimentos, debido a su elevada presencia en los alimentos, su resistencia térmica y la capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración (Meer *et al.*, 1991; Kotiranta *et al.*, 2000). Destacar de esta especie, la capacidad para formar esporas y su habilidad para crecer formando biopelículas (Andersson *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 2006), lo que les hace más resistentes a los desinfectantes o detergentes utilizados (Peng *et al.*, 2002; Lindsay *et al.*, 2002), persistiendo en las instalaciones y constituyendo una vía de contaminación frecuente de los alimentos. Además, *B. cereus* ha sido relacionado con la producción de factores de virulencia.

*Bacillus cereus* puede provocar una amplia gama de infecciones oportunistas, siendo las infecciones oculares y la sepsis asociada a catéter, las enfermedades más frecuentes. También puede provocar dos tipos de infecciones alimentarias, conocidas como síndrome emético y síndrome diarreico. Una enterotoxina termoestable y resistente a la proteólisis produce la forma emética de la enfermedad, aunque otras tres toxinas termolábiles pueden ser sintetizadas.

Para finalizar destacar, que las esporas de *B. cereus* pueden sobrevivir al tratamiento UHT de la leche. En los alimentos, si las condiciones de almacenamiento lo permiten, las esporas pueden germinar resultando en células vegetativas capaces de multiplicarse en el alimento. Normalmente aparece en concentraciones inferiores a  $10^3$  ufc/g, considerada inocua (Hobbs y Gilbert, 1974); para provocar intoxicaciones alimentarias se requieren de  $10^5 - 10^8$  células viables o esporas por gramo (Granum, 1994).

### ***Escherichia coli***

Las bacterias de la especie *E. coli* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos cortos, Gram-negativos, quimioheterótrofos, catalasa positivos, oxidasa negativos y anaerobios facultativos. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar. Su metabolismo rojo de metilo positivo y Voges Proskauer negativo indican que fermentan los hidratos de carbono por vía ácido mixta. A su vez puede producir ácido y gas a partir de glucosa, lactosa, fructosa, galactosa, maltosa, arabinosa, xilosa, ramnosa y manitol. Puede fermentar o no, según los casos, la sacarosa, rafinosa, salicina, esculina, dulcitol y glicerina.

Las cepas de *E. coli* se pueden diferenciar unas de otras teniendo como base sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K) (Evans *et al.*, 1979).

La mayoría de las cepas pertenecientes a la especie *E. coli* forman parte de la microbiota normal del intestino del hombre y animales de sangre caliente. Su presencia en los alimentos es índice de contaminación fecal.

### **Listeria**

*Listeria* es un bacilo corto, de 0.4- 0.5  $\mu\text{m}$  de largo con los extremos redondos, no tiene cápsula y es asporógeno. Es móvil a 25°C, gracias a unos flagelos peritricos mostrando una característica movilidad de volteo, pero no es móvil a 37°C. El desarrollo de los flagelos puede ser tan escaso que la movilidad puede llegar a ser imperceptible o nula.

Es una bacteria Gram- positiva, catalasa positiva, oxidasa negativa y anaerobia facultativa. Produce citocromos y tiene un metabolismo fermentativo de la glucosa produciendo principalmente L (+) ácido láctico. Es rojo de metilo-positiva y Voges Proskauer positiva; no produce citrato exógeno ni índol. Además, hidroliza la esculina, pero no la urea (Seeliger y Jones, 1986). La temperatura óptima de crecimiento está entre 30 y 37°C, aunque sobrevive desde -0.1 a 45°C (Walker *et al.* 1990, Duché *et al.*, 2002), y sus límites de pH de crecimiento se sitúan entre 4.6 y 9.2 (ICMSF, 2000). Además, listeria puede sobrevivir a 10% NaCl, y las concentraciones de nitritos permitidas en los alimentos (Duché *et al.*, 2002).

A pesar de no formar esporas, es capaz de sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados en medios diferentes. Es un organismo psicrótrofo, por lo que el almacenamiento en frío no inhibe el crecimiento de las listerias.

*Listeria monocytogenes* es un patógeno oportunista, capaz de sobrevivir y multiplicarse fuera de los hospedadores animales y en medios nutritivos simples. Todas las cepas de *L. monocytogenes* son hemolíticas y la producción de hemolisinas es una propiedad asociada a la patogenicidad, ya que todas las cepas no hemolíticas son apatógenas.

La infección en humanos es poco frecuente, limitándose a poblaciones tales como recién nacidos, ancianos, embarazadas e inmunodeprimidos. En lo referente a los alimentos, *Listeria monocytogenes* se aísla de numerosos

alimentos crudos y se encuentra con frecuencia en los ambientes de producción y procesamiento de los alimentos, especialmente en carne y productos cárnicos (Farber *et al.*, 1993). Aunque *Listeria* se encuentre en algunos animales, es probable que la contaminación de la carne y productos cárnicos se produzca durante el procesado, siendo el matadero una fuente importante de contaminación de los productos cárnicos con *L. monocytogenes* (Toca, 1998). A su vez, *Listeria* fue aislada en desagües, agua estancada, residuos y superficie de contacto con los alimentos de los equipos de planta de producción de alimentos. Además se encontró en cámaras de refrigeración a 5°C (Pociecha *et al.*, 1991), cintas transportadoras y superficies de cortar de las tablas de una sala de despiece de pollos (Toca, 1998). Es también frecuente la contaminación de hortalizas frescas, pero las cifras son bajas.

---

### 3.- Los agentes antimicrobianos

---

#### 3.1.- Biocidas

La legislación europea (Reglamento nº 528/ 2012 del Parlamento europeo y del Consejo de 22 de mayo de 2012, y sucesivas modificaciones) define a los biocidas como:

- Toda sustancia o mezcla, en la forma en que se suministra al usuario, que esté compuesto por, o genere, una o más sustancias activas, con la finalidad de destruir, contrarrestar o neutralizar cualquier organismo nocivo, o de impedir su acción o ejercer sobre él un efecto de control de otro tipo, por cualquier medio que no sea una mera acción física o mecánica.

- Toda sustancia o mezcla generada a partir de sustancias o mezclas distintas de las contempladas en el anterior guión, destinadas a ser utilizada con la intención de destruir, contrarrestar o neutralizar cualquier organismo nocivo, o de impedir su acción o ejercer sobre él un efecto de control de otro tipo, por cualquier medio que no sea una acción física o mecánica.

##### 3.1.1 Tipos de biocidas

Los biocidas se pueden clasificar según su mecanismo de acción o según su uso.

*Tipos de biocidas según su mecanismo de acción*

### *A.- Biocidas oxidantes*

Los biocidas oxidantes, tal y como indica su nombre, oxidan la materia orgánica (material celular, enzimas, proteínas, etc.) y, por consiguiente, provocan la muerte de los microorganismos. En este grupo están el cloro, bromo, yodo, dióxido de cloro, ozono, peróxido de hidrógeno, oxonia6P, junto con algunas sales halógenas y de peróxido. En el caso del cloro y sus derivados, normalmente se forman enlaces estables entre el nitrógeno de las proteínas y el cloro, llevando a la destrucción de los microorganismos. Su actividad desinfectante tiene una dependencia del pH, y la presencia de grandes cantidades de materia orgánica y de amoníaco en el agua puede conllevar problemas a la hora de controlar la contaminación biológica con este tipo de biocidas.

#### *A1.- Oxonia*

El Oxonia P3 activo se basa en un preparado comercial con peróxido de hidrógeno (25- 35%), ácido acético (5- 15%) y ácido peracético (2- 5%). Éstos pueden provocar acidificación del citoplasma e inhibición de algunas funciones (Ortega-Morente *et al.*, 2013).

#### *A2.- Topax 66*

Este compuesto posee en su composición el hidróxido de sodio (2- 5%), el hipoclorito de sodio (2- 5%) y el óxido de alquilamina (2- 5%).

Su principal efecto, por su composición en hipoclorito, sería la lisis celular de la pared celular en bacterias Gram- negativas (Ortega- Morente *et al.*, 2013).

### *B.- Biocidas no oxidantes*

Los agentes “no oxidantes” usan diferentes mecanismos en su acción biocida. Su acción desencadena una alteración del metabolismo celular y/o su estructura, provocando la muerte de los microorganismos. Existen muchos tipos de biocidas no oxidantes, pero en general todos cumplen los siguientes requisitos: son más estables y persistentes que los biocidas oxidantes y su actividad es independiente del pH. Cada biocida de este tipo tiene su mecanismo de actuación particular, no pudiéndose generalizar un mecanismo de actuación para todo el grupo.

#### *B.1.- Amonio cuaternario*

Las sales de amonio cuaternario (QCA) son biocidas catiónicos, desarrollados en 1935. Como estructura básica poseen al ión amonio  $\text{NH}_4^+$ , donde cada uno de los

hidrógenos está sustituido generalmente por radicales hidrófobos de tipo alquil y aril. La principal ventaja de estos compuestos es su elevada estabilidad, baja corrosividad y baja toxicidad (McDonnel y Russel, 1999; Cervinkova *et al.*, 2013), aunque la presencia de cualquier residuo proteico anula su efectividad; además, son incoloros, inodoros, no irritantes y desodorantes. Son sustancias desinfectantes, que actúan especialmente en medios alcalinos y a temperaturas elevadas. Tienen una acción detergente y son solubles en agua y alcohol.

Estos compuestos son particularmente activos contra bacterias Gram-positivas, ante las que muestran actividad a concentraciones extremadamente bajas; sin embargo, el efecto sobre las bacterias Gram- negativas es menor y requiere concentraciones más elevadas (Gilbert y Moore, 2005; Ortega- Morente *et al.*, 2013).

De los derivados del amonio cuaternario, el *cloruro de benzalconio* se presenta como mezclas de *n*-alquildimetilbencil cloruro de amonio, donde el grupo *n*- *alquil* posee longitud variable (Gilbert y Moore, 2005). Fue el primer compuesto de este tipo introducido en el mercado.

La *cetrimida*, cuya composición se presenta como mezclas de *n*-alquilmetilamonio bromuro, donde el grupo *n*- *alquil* (parte hidrófoba) contiene entre 8 y 18 carbonos (Gilbert y Moore, 2005).

El *hexadecilpiridinio* (Cloruro de hexadecilpiridinio) es un agente antibacteriano utilizado como conservante y desinfectante. Su efecto ha sido demostrado frente a *Bacillus cereus* y *B. weihenstephanensis*.

Los grupos alquil de estos compuestos sintéticos suelen provenir de aceites naturales, que son a su vez mezclas heterogéneas de cadenas de ácidos grasos de entre 6- 22 carbonos; así, la capacidad antimicrobiana dependerá tanto del número de carbonos de la cadena como del número de insaturaciones (Gilbert y Moore, 2005). Por lo tanto, la longitud de la cadena *n*- *alquil*, será un factor relevante para la acción antimicrobiana: cuando  $n= 12-16$ , el compuesto tendrá efectividad máxima frente a bacterias Gram-positivas; si  $n= 14-16$ , la actividad será óptima frente a bacterias Gram-negativas; y cuando  $n < 4$  ó  $n > 18$  el compuesto será inactivo (Gilbert y Moore, 2005).

El modo de acción de los QCAs de manera general, se debe a la perturbación de la bicapa lipídica, constituyente de la membrana citoplasmática y la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, desencadenando la salida de material

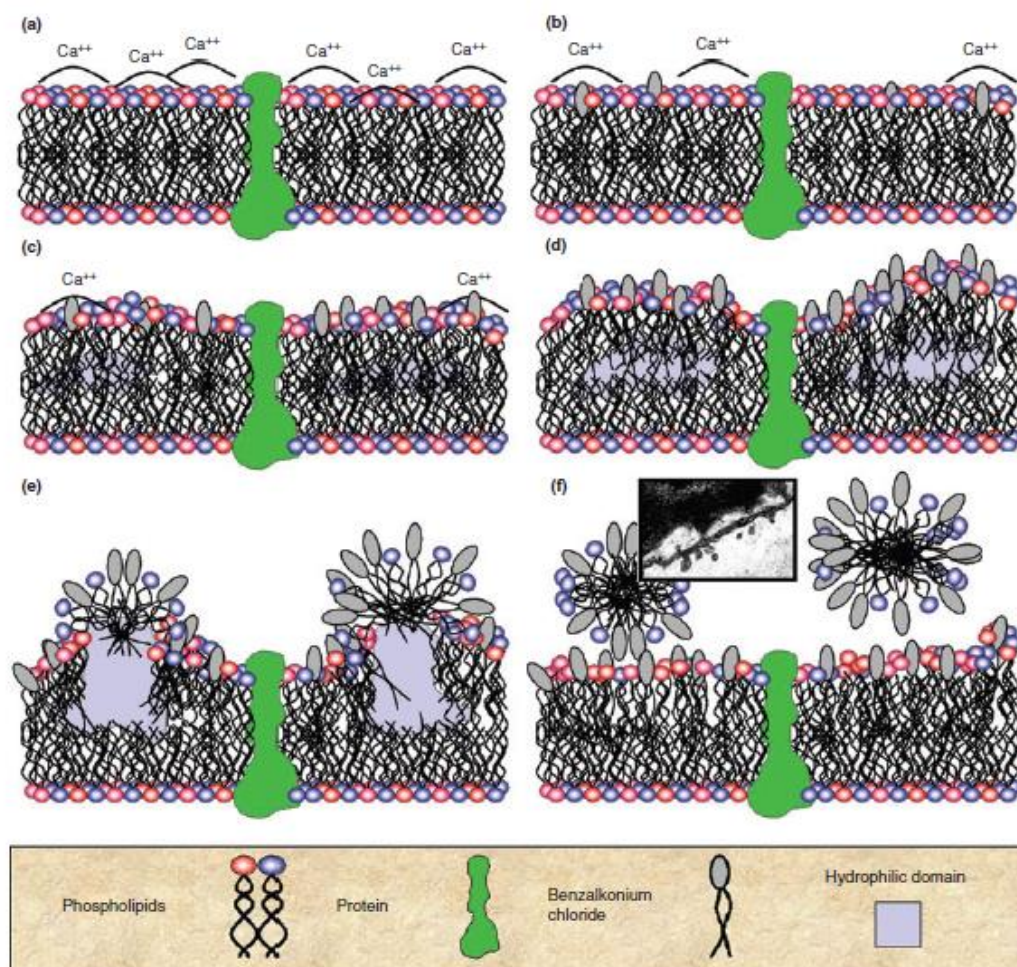
citoplasmático al exterior. Así, bajas concentraciones de QCAs se unen firmemente a las zonas aniónicas de la superficie de la membrana, causando pérdida de la capacidad de osmorregulación y la salida de compuestos (Lambert y Hammond, 1973; Gilbert y Moore, 2005); niveles intermedios de antimicrobiano, perturbarían distintas funciones fisiológicas producidas en la membrana, como el transporte, la biosíntesis de la pared, etc. (Salt y Wiseman, 1970, Gilbert y Moore, 2005); y altas concentraciones matan la célula por solubilización de la membrana (Salton, 1951, 1968; Gilbert y Moore, 2005).

A nivel molecular la capacidad antimicrobiana se debe a la asociación del amonio (cargado positivamente), con la cabeza de los grupos polares de los fosfolípidos de la membrana, mientras que la cola hidrófoba se integra en el núcleo hidrófobo de la membrana (Figura 1); así, a bajas concentraciones de biocida (cercanas a la concentración mínima inhibitoria “MIC”), la interacción aumenta la presión sobre la superficie llevando a la disminución de fluidez y a la pérdida de funciones fisiológicas y de osmorregulación (Gilbert y Moore, 2005).

Los QCAs se han empleado desde 1930, aunque se ha observado un aumento de las resistencias hacia este antimicrobiano (Gilbert y Moore, 2005). Las principales causas del aumento de la resistencia se deben a modificaciones en el contenido de fosfolípidos (Wright y Gilbert, 1987, Gilbert y Moore, 2005) y a la adquisición o aumento de la expresión de bombas de exporte (Heir *et al.*, 1999; Gilbert y Moore, 2005).

Hay algunas especies bacterianas insensibles a QCAs, como son *Pseudomonas aeruginosa*, debido a la incapacidad de los biocidas a atravesar su membrana externa. Determinados compuesto pueden ayudar a que el biocida traspase la membrana, como son el EDTA, capaz de secuestrar los cationes divalentes de la membrana externa (Gilbert y Moore, 2005) o la lecitina o compuestos parecidos a ésta, con capacidad de ejercer una acción quelante sobre el biocida e impedir su unión a los fosfolípidos de la membrana (Terleckyj *et al.*, 1995; Ortega-Morente *et al.*, 2013).





**Figura 1.- Mecanismo de acción de la familia QACs.** Las imágenes muestran la adsorción progresiva de las cabezas polares del amonio cuaternario sobre la zona ácida de los fosfolípidos (Gilbert y Moore, 2005).

## B.2.- Bis Fenoles

Los bisfenoles son derivados hidroxi-halogenados de dos grupos fenólicos, conectados por varios puentes (McDonnell y Russell, 1999). Su efecto se basa en la desnaturalización de proteínas y en la inactivación de enzimas de la membrana, alterando la permeabilidad. En general, exhiben un amplio espectro de eficacia, pero tienen poca actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* y mohos y son esporostáticos frente a esporas bacterianas (McDonnell y Russell, 1999).

*Triclosán.* Es un derivado fenólico, el 2,4,4, triclora-2-hidroxidifenil éter, antimicrobiano de amplio espectro. Su uso se centra en los productos de consumo como jabones, detergentes, pasta dental y cosméticos. El triclosán ejerce su acción

inhibiendo la biosíntesis de los ácidos grasos, más concretamente actúa formando un complejo con la enzima enoil- acil reductasa (FabI), para lo que requiere el cofactor  $\text{NAD}^+$  (McMurry *et al.*, 1999; Kuo *et al.*, 2003; Sivaraman *et al.*, 2003). Se ha observado como el triclosan se une al enzima y forma el complejo: FabI- $\text{NAD}^+$ -Triclosan, inhibiendo así, a FabI de *E. coli*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*; también se une a su homóloga InhA en *Mycobacterium* y *Plasmodium* (McMurry *et al.*, 1999; Kuo *et al.*, 2003; Sivaraman *et al.*, 2003; Ortega- Morente *et al.*, 2013).

**Hexaclorofeno.** El hexaclorofeno es un desinfectante derivado del fenol, el 2,2'-dihidroxi -3,5,6,3',5',6'-hexaclorodifenilmetano. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la parte de unión a la membrana de la cadena de transporte de electrones y los efectos secundarios derivados de esto (McDonnell y Russell, 1999). Sumado a todo lo anterior, se produce también la inhibición de la respiración, lisis de protoplasto y salida de compuestos al exterior. Destacar que es un compuesto tóxico, especialmente en neonatos (McDonnell y Russell, 1999).

### B.3.- Biguanidas

Las biguanidas fueron sintetizadas a principios del siglo XX y han intervenido en el desarrollo de un gran número de medicinas (Gilbert y Moore, 2005), entre ellos, compuestos antimicrobianos como los que vamos a comentar a continuación.

Estos compuestos funcionan a un pH determinado, entre 5 y 7 para la clorhexidina y alexidina y entre 5 y 10 en el caso de las biguanidas poliméricas. Todos son incompatibles con los detergentes aniónicos y los compuestos inorgánicos. Su efecto letal se debe a la reacción con los grupos cargados negativamente de las membranas biológicas, alterando su permeabilidad.

**Clorhexidina.** Es el representante más característico de las biguanidas. Constituye uno de los tres antisépticos quirúrgicos más importantes y es el antiséptico bucal que más se usa actualmente (McDonnell y Russell, 1999; Gilbert y Moore, 2005). Tiene un amplio espectro de actividad y es poco irritante. La clorhexidina es insoluble en agua, por lo que suele utilizarse en forma de sal (gluconato) que la hace más soluble. Su estabilidad es buena a temperatura ambiente, necesita ser protegida de la luz y se inactiva en presencia de materia orgánica (McDonnell y Russell, 1999).

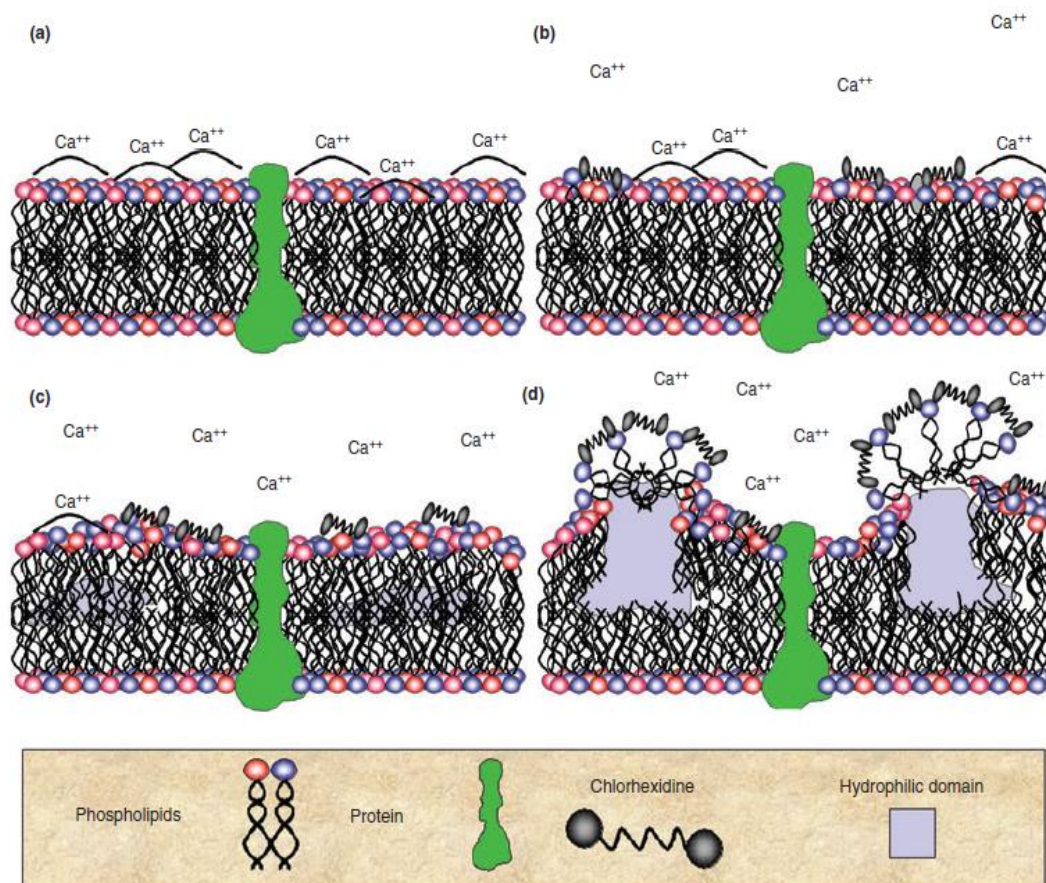
La primera diana de la clorhexidina es la membrana citoplasmática, dando como resultado la modificación de la permeabilidad, debido a la interacción electrostática con los fosfolípidos ácidos y proteínas. Lo que ocurre principalmente es

que, la clorhexidina provoca el desplazamiento de los iones  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  de la pared y de la membrana. Debido a su estructura de 6 carbonos, el biocida es algo inflexible y por lo tanto incapaz de doblarse para entrelazarse en la bicapa; así, cada molécula de clorhexidina actúa como un puente, uniéndose a dos cabezas polares de fosfolípidos y desplazando los cationes divalentes asociados a éstos (Figura 2) (Gilbert y Moore, 2005). Por lo tanto, la unión es el punto crítico de su acción bactericida, que se ve afectada significativamente si su estructura es mayor o menor a 6 carbonos (Davies *et al.*, 1954; Gilbert y Moore, 2005).

Así, en un primer momento, la clorhexidina atraviesa la membrana externa o pared celular, ocasionando un daño insuficiente como para producir la lisis bacteriana, por lo que el biocida continúa su camino hacia el interior de la célula, donde provoca ya sí, los daños a nivel de la membrana citoplasmática al interaccionar con los fosfolípidos. Ésto conlleva a la disminución de la fluidez de la misma y la alteración de la permeabilidad y de la actividad metabólica de la membrana y sus enzimas (McDonnell y Russell, 1999; Gilber y Moore, 2005; Ortega- Morente *et al.*, 2013), provocando finalmente la muerte celular.

Se ha demostrado que la absorción por difusión pasiva a través de las membranas es extraordinariamente rápida tanto en las bacterias como en las levaduras, consiguiéndose un efecto máximo en 20 segundos (Fitzgerald *et al.*, 1989; McDonnell y Russell, 1999; Hiom *et al.*, 1992).

La clorhexidina puede comportarse también como inhibidor de la unión de la adenosina trifosfato (ATP) a la membrana; aunque éste efecto sólo ocurre a altas concentraciones (Chopra *et al.*, 1987; Kuyyakanond y Quesnel, 1992; Ortega- Morente *et al.*, 2013).



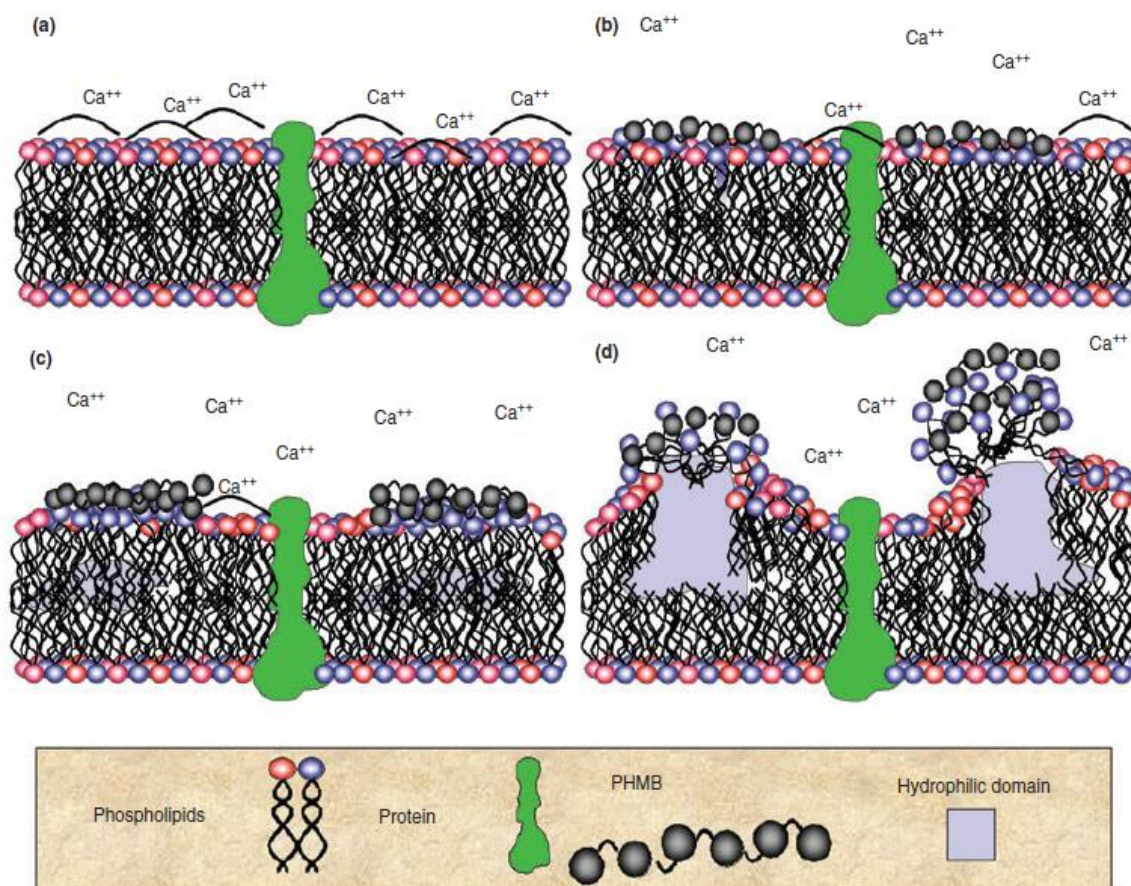
**Figura 2.- Representación gráfica de la interacción de la clorhexidina con la na plasmática (Gilbert y Moore, 2005).**

Los efectos de la clorhexidina son dependientes de la concentración utilizada; así, a bajas concentraciones se produce una alteración de la permeabilidad osmótica de la membrana y una inhibición de las enzimas del espacio periplásmico; sin embargo, a concentraciones elevadas, las interacciones son más intensas, pudiéndose adoptar un estado líquido al perder su integridad y la salida de todo el material celular (Gilbert y Moore, 2005). La clorhexidina posee un amplio espectro de acción: es bactericida sobre bacterias Gram-positivas pero inefectiva frente a *Providentia* spp. y *Pseudomonaceae* (Thomas y Stickler, 1979; Gilber y Moore, 2005). Las micobacterias son altamente resistentes a la clorhexidina, si bien esta última puede tener una acción bacteriostática sobre ellas. Además, la clorhexidina tiene poco efecto sobre las esporas bacterianas, pero inhibe el crecimiento de las esporas durante su germinación. Es activa frente a levaduras y mohos.

*Polihexametileno biguanidas (PHMB).* Al igual que el resto de las biguanidas, su mecanismo de acción se basa en la interacción con los



fosfolípidos de la membrana (Ikeda *et al.*, 1983; Ortega- Morente *et al.*, 2013), pero su acción biocida es muy superior al resto (Gilbert y Moore, 2005), provocando la alteración de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (Broxton *et al.*, 1984; Ortega- Morente *et al.*, 2013).



**Figura 3.- Representación del mecanismo de acción de PHMB sobre la membrana citoplasmática (Gilbert y Moore, 2005).**

El biocida se une a la membrana citoplasmática, pero también al lipopolisacárido y al peptidoglicano de la pared celular. Los puentes formados por el polímero, como ocurría en las otras biguanidas, son hidrófobos e inflexibles y no pueden unirse al cuerpo hidrófobo de la membrana celular. Así, de nuevo, se vuelve a producir una interacción entre los fosfolípidos y el antimicrobiano (Figura 3) (Broxton *et al.*, 1984; Ikeda *et al.*, 1985; Gilbert y Moore, 2005), aunque la diferencia reside en que la interacción biocida-fosfolípido tiende a realizarse alrededor de proteínas integrales (Ikeda *et al.*, 1983; Ikeda *et al.*, 1984; Gilbert y Moore, 2005) y las uniones no se restringen a

pares de fosfolípidos adyacentes. El resultado final es la pérdida total de permeabilidad (Ikeda *et al.*, 1985).

*Alexidina*. Ésta se difiere de la clorhexidina por la posesión de grupos etil- hexil. Los procesos de alteración de la membrana son mucho más eficaces y rápidos que el anterior biocida (McDonnel y Russell, 1999).

#### *Tipos de biocidas según su uso*

El Reglamento (UE) nº 528/ 2012 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de mayo de 2012, establece 4 grupos de biocidas, divididos en 22 tipos de productos (Tabla 6).

**Tabla 6.- Tipos de biocidas según su uso (Modificado de: <http://echa.europa.eu/regulations/biocidal-products-regulation/product-types>).**

Número	Tipo de producto	Descripción
<b>Grupo principal 1: Desinfectantes:</b> Estos tipos de biocidas excluyen los biocidas de limpieza que no persiguen un efecto biocida, incluidos los detergentes líquidos y en polvo y productos similares.		
TP 1	Higiene humana	Los productos de este grupo son los biocidas empleados con fines de higiene humana, que se aplican sobre la piel o el cuero cabelludo o en contacto con ellos, con la finalidad principal de desinfectar la piel o el cuero cabelludo.
TP 2	Desinfectantes y alguicidas no destinados a la aplicación directa a personas o animales	Empleados para la desinfección de superficies, materiales, equipos y muebles que no se utilizan en contacto directo con alimentos o piensos. Los ámbitos de utilización incluyen, entre otros, las piscinas, acuarios, aguas de baño y otras; los sistemas de aire acondicionado, y las paredes y suelos de lugares privados o públicos, zonas industriales y otras zonas destinadas a actividades profesionales. Utilizados para la desinfección del aire, el agua no destinada al consumo humano o animal, retretes químicos, aguas residuales, desechos de hospitales y tierra. Utilizados como alguicidas para el tratamiento de piscinas, acuarios y otras aguas y para el tratamiento reparador de materiales de construcción. Destinados a ser incorporados en textiles, tejidos, mascarillas, pinturas y otros artículos o materiales con el fin de obtener artículos tratados con propiedades desinfectantes.
TP 3	Higiene veterinaria	Empleados con fines de higiene veterinaria, como los desinfectantes, jabones desinfectantes, productos de higiene bucal o corporal o con funciones antimicrobianas.

		Utilizados para la desinfección de materiales y superficies relacionados con el alojamiento o transporte de animales.
TP 4	Alimentos y piensos	Empleados en la desinfección de equipos, recipientes, utensilios para consumo, superficies o tuberías relacionados con la producción, transporte, almacenamiento o consumo de alimentos o piensos (incluida el agua potable) para personas y animales.  Empleados para impregnar materiales que puedan estar en contacto con alimentos.
TP 5	Agua potable	Empleados para la desinfección del agua potable, tanto para personas como para animales.
Grupo principal 2: Conservantes: Salvo que se indique lo contrario, este tipo de productos solo abarca los destinados a prevenir el crecimiento de microbios y algas.		
TP 6	Conservantes para los productos durante su almacenamiento	Empleados para la conservación de productos elaborados que no sean alimentos, piensos, productos cosméticos o medicinales ni productos sanitarios, mediante el control del deterioro microbiano con el fin de prolongar su vida útil.  Empleados como conservantes para el almacenamiento o utilización de cebos rodenticidas, insecticidas o de otro tipo.
TP 7	Conservantes para películas	Empleados para la conservación de películas o recubrimientos mediante el control del deterioro microbiano o del crecimiento de algas, con el fin de proteger las propiedades iniciales de la superficie de materiales u objetos como pinturas, plásticos, selladores, adhesivos murales, aglutinantes, papeles u obras de arte.
TP 8	Protectores para maderas	Empleados para la protección de la madera, desde la fase del aserradero inclusive, o los productos derivados de la madera, mediante el control de los organismos que destruyen o alteran la madera, incluidos los insectos. Se incluyen en este tipo de producto tanto los de carácter preventivo como curativo.
TP 9	Protectores de fibras, cuero, caucho y materiales polimerizados	Empleados para la conservación de materiales fibrosos o polimerizados, como cuero, caucho o papel, o productos textiles mediante el control del deterioro microbiano. Este tipo de producto incluye los biocidas que impiden el depósito de microorganismos en la superficie de los materiales y, por consiguiente, inhiben o impiden la aparición de malos olores o presentan ventajas de otro tipo.
TP 10	Conservantes de materiales de construcción	Empleados para la conservación de materiales de albañilería, materiales compuestos u otros materiales de construcción distintos de la madera mediante el control de los ataques microbianos y por algas.
TP 11	Protectores para líquidos utilizados en sistemas de refrigeración y en procesos industriales	Empleados para la conservación del agua u otros líquidos utilizados en sistemas de refrigeración y en procesos industriales mediante el control de los organismos nocivos como microbios, algas y mejillones. No se incluyen en este tipo de producto los productos empleados para la desinfección del agua potable o del agua

		de piscina.
TP 12	Productos antimoho	Empleados para la prevención o el control de la proliferación de mohos sobre los materiales, equipos y estructuras utilizados en procesos industriales, por ejemplo la madera y pulpa de papel, estratos de arena porosa en la extracción de petróleo.
TP 13	Protectores de líquidos empleados para trabajar o cortar materiales	Productos para controlar el deterioro microbiano de los líquidos empleados para trabajar o cortar metales, cristales u otros materiales.
Grupo principal 3: Plaguicidas		
TP 14	Rodenticidas	Empleados para el control de los ratones, ratas u otros roedores, por medios distintos de la repulsión o la atracción.
TP 15	Avicidas	Empleados para el control de las aves, por medios distintos de la repulsión o la atracción.
TP 16	Molusquicidas, vermícid y productos para controlar otros invertebrados	Empleados para el control de moluscos, gusanos e invertebrados no cubiertos por otros tipos de producto, por medios distintos de la repulsión o la atracción.
TP 17	Piscicidas	Empleados para el control de los peces, por medios distintos de la repulsión o la atracción.
TP 18	Insecticidas, acaricidas y productos para controlar artrópodos	Empleados para el control de los artrópodos (por ejemplo, insectos, arácnidos y crustáceos), por medios distintos de la repulsión o la atracción.
TP 19	Repelentes y atrayentes	Empleados para el control de los organismos nocivos (invertebrados como las pulgas; vertebrados como las aves, peces, roedores), mediante repulsión o atracción, incluidos los que se utilizan para la higiene veterinaria o humana, ya sea directamente sobre la piel o indirectamente en el entorno de las personas o animales.
TP 20	Control de otros animales vertebrados	Empleados para el control de vertebrados distintos de los cubiertos por los demás tipos de producto de este grupo principal, por medios distintos de la repulsión o la atracción.
Grupo principal 4: Otros biocidas		
TP 21	Productos antiincrustantes	Empleados para el control de la fijación y crecimiento de organismos incrustantes (microbios o formas superiores de especies animales o vegetales) en barcos, equipos de acuicultura u otras estructuras acuáticas.
TP 22	Líquidos para embalsamamiento y taxidermia	Empleados para la desinfección y conservación de cadáveres animales o humanos o de partes de los mismos.



### 3.1.2.- *Requisitos de los biocidas*

Como criterios prioritarios, los biocidas no pueden presentar un efecto carcinógeno, mutagénico ni tóxico para la reproducción de categorías 1A o 1B, salvo excepciones (Reglamento 528 /2012).

Los biocidas deben tener un amplio espectro de acción microbiológica, deben ser bactericidas frente a todas las bacterias vegetativas no esporuladas, incluyendo micobacterias y no deberían ser inactivados por la materia orgánica. Otras características, como que el biocida disponga de un método indicativo para que el usuario conozca si el producto está activo o no en el momento del uso, que sea fácil de utilizar y que sea biodegradable, son requisitos a tener en cuenta. Por otro lado, el costo del empleo de biocidas debe ser razonable, para asegurar la previsión de existencias de este tipo de productos en las empresas.

### 3.1.3.- *Mecanismos de acción de los biocidas*

A diferencia de los antibióticos, que afectan a una diana específica, la mayor parte de los biocidas interactúan con diversas moléculas e interfieren en varios procesos fisiológicos (Denyer, 1995; Russell y Chopra, 1996; Poole, 2002). Sin embargo, a concentraciones bajas o sub-inhedoras pueden reducir su acción a una sola diana (Hugo, 1967; Russell y Maillard, 2000).

Los microorganismos desarrollan distinta respuesta a los biocidas, dependiendo de su estructura, fisiología, replicación y metabolismo. Estos antimicrobianos actúan sobre múltiples puntos o dianas, por lo que al ejercer su acción sobre diversos componentes, no es fácil el distinguir entre los efectos primarios o secundarios que contribuyen a la acción bactericida. Así, muchos productos biocidas interactúan con la superficie celular y una vez en el interior del microorganismo, pueden dañar uno o más componentes celulares. Sin embargo, podemos resumir, que los efectos de los biocidas se centran en tres aspectos:

- Interacciones con los componentes externos
- Interacciones con la membrana citoplasmática
- Interacciones con componentes citoplasmáticos

- *Interacciones con componentes celulares externos.*

La primera reacción de cualquier antibacteriano, es la interacción con componentes de la membrana, en el caso de las bacterias Gram-negativas, y su posterior avance al interior de la célula en busca de su diana. En general, este tipo de bacterias son mucho menos sensibles a los biocidas que las Gram-positivas debido a su membrana externa. Así, los biocidas catiónicos como la clorhexidina y el cloruro de benzalconio que interaccionan con las cargas negativas de la pared celular y membrana externa de las Gram-negativas (Gilbert y Moore, 2005, Ortega- Morente *et al.*, 2013) serían integrantes de este grupo.

- *Interacciones a nivel de la membrana citoplasmática*

La membrana citoplasmática está compuesta esencialmente de fosfolípidos y proteínas, por lo que es el sitio donde el mayor número de biocidas tienen su diana de acción.

En este apartado podríamos incluir a las biguanidas y QACs, quienes se unen a los fosfolípidos, induciendo cambios en la membrana y alteraciones en la osmorregulación. El hexaclorofeno inhibe la parte unida a la membrana de la cadena de transporte de electrones a baja concentración, mientras que a alta concentración provoca la salida de compuestos intracelulares (Ortega- Morente *et al.*, 2013), mientras que el triclosan, ya que actúa sobre la biosíntesis de ácidos grasos de la bacteria, ejerciendo su acción sobre FabI (McMurry *et al.*, 1999; Sivaraman *et al.*, 2003; Ortega- Morente *et al.*, 2013).

- *Interacciones con constituyentes citoplasmáticos: Interacciones con ácidos nucleicos, ribosomas u otros.*

Los biocidas oxidantes, oxidan diversos compuestos, causando daños en la estructura: disrupción de membranas, disrupción de la síntesis de proteínas, oxidación del oxígeno, etc., que pueden dar como resultado final la muerte de la célula (Dean *et al.*, 1997; Finnegan *et al.*, 2010; Ortega- Morente *et al.*, 2013). A su vez, el peróxido de hidrógeno, puede provocar daños en los ribosomas, aunque no son sus sitios de acción primaria (Miall y Walker, 1966; Wang y Matheson, 1967; Nakamura y Tamaoki, 1968; Ortega- Morente *et al.*, 2013).

#### 3.1.4.- Sensibilidad a los biocidas

La composición del medio y las condiciones de crecimiento influyen en la sensibilidad de los microorganismos a los biocidas.

- Las bacterias Gram-positivas, cuando crecen en presencia de glicerol o en caldos de cultivo que contienen glicerol, experimentan alteraciones en la capa lipídica de la pared celular que afecta a su sensibilidad frente a los compuestos fenólicos (Russell, 1999).

- Algunas bacterias Gram-negativas, como los pseudomonads, son muy resistentes a los biocidas cuando crecen en medios de cultivos con escasos nutrientes (Russell, 1999).

- El crecimiento de *E. coli* en medios que contienen L-alanina inducen el crecimiento de bacterias con una permeabilidad incrementada y por tanto más sensibles a los desinfectantes (Russell, 1999).

- El déficit de  $Mg^{+2}$  provoca cambios importantes en la pared celular de *P. aeruginosa*, asociados a la resistencia al EDTA, cloro y xilenol (Russell, 1999).

- Las bacterias que se multiplican activamente en fase logarítmica son más sensibles a los biocidas que las bacterias provenientes de una fase estacionaria de crecimiento (Gardner y Peel, 1998). Por tanto, en los ensayos de evaluación se deben emplear, para la preparación del inóculo, microorganismos en fase estacionaria de la curva de crecimiento.

- Las bacterias en suspensión en un medio líquido son más sensibles a los biocidas que las bacterias adheridas y fijadas sobre una superficie (Lorian, 1989). Por otro lado, los microorganismos pueden organizarse en biopelículas para adherirse a las superficies, e interferir en la evaluación de la actividad biocida.

#### 3.1.5.- Mecanismos de resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana a los biocidas se conoce desde 1950, cuando se trabajaba con formulaciones de biocidas catiónicos (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, SCHENHIR, 2009). El término de resistencia a antisépticos y desinfectantes designa a un aislamiento microbiano que no es sensible a la concentración de biocida usada o que no es inactivado por concentraciones que inhiben o inactivan la mayoría de cepas de ese microorganismo. La resistencia ha

emergido principalmente, por el mal uso o almacenamiento de los compuestos, dando como resultado un descenso en la efectividad de las concentraciones usadas (SCENIHR, 2009).

En la respuesta a los biocidas entran en juego, tanto el propio agente químico como el organismo involucrado, aunque también pueden intervenir en el proceso otros factores como son la temperatura, el pH, la presencia de materia orgánica, etc. (Russell, 1992; Ortega- Morente *et al.*, 2013).

Los mecanismos de tolerancia a los biocidas pueden resumirse de acuerdo a las características estructurales en mecanismos intrínsecos y adquiridos, tal y como estableció Russell (1995), así tenemos:

- un mecanismo de “insensibilidad” intrínseco o innato: en este caso, el biocida no es capaz de alcanzar su diana de acción, a la concentración suficientemente elevada como para producir un efecto letal. Las causas de ésto pueden ser, desde la impermeabilidad celular a la existencia de enzimas de tipo degradativo.

- un mecanismo de resistencia adquirida: debido a la aparición de mutaciones o a la adquisición de plásmidos o transposones (Poole, 2002). Se ha observado que la adquisición de plásmidos de resistencia está mediada por compuestos de mercurio y otras sales (McDonnell y Russell, 1999).

### MECANISMOS INTRINSECOS

Para que un antimicrobiano pueda alcanzar su diana, debe en primer lugar, traspasar las barreras externas. La naturaleza y composición de estas barreras, dependen del tipo de organismo y, en algunos casos, éstas pueden ser impermeables al compuesto (Russell, 1995; Russell y Chopra, 1996, McDonnell y Russell, 1999); en otras ocasiones, lo que puede ocurrir es, que determinadas enzimas degraden el compuesto antimicrobiano (Hugo, 1991b; Ogase *et al.*, 1992, Bloomfield, 1999; McDonnell y Russell, 1999); otras veces, propiedades cromosómicamente controladas, permiten eludir la acción del antimicrobiano (McDonnell y Russell, 1999), lo que explica como las bacterias Gram-negativas son mucho más resistentes que las Gram-positivas.

El mecanismo intrínseco más estudiado es el cambio en la permeabilidad de la envoltura microbiana, quien limita las cantidades de biocida que penetran en la célula, disminuyendo la concentración del biocida en su interior (Denyer y Maillard, 2002;

Lambert, 2002; Champlin *et al.*, 2005; SCENIHR, 2009). Dicha capacidad se desarrolla en las esporas (Russell, 1990; Russell *et al.*, 1997; Cloete, 2003), pero también en células vegetativas de micobacterias y otras bacterias Gram-positivas (SCENIHR, 2009).

En las micobacterias, la pared celular posee una composición especial en arabinogalactanos, lo que les proporciona una barrera muy efectiva a la entrada de antimicrobianos, reduciendo por tanto, la concentración de biocida que penetra dentro de la célula (Broadley *et al.*, 1995; Manzoor *et al.*, 1999; McDonnell y Russell, 1999; Walsh *et al.*, 2001; Hawkey, 2004; SCENIHR, 2009), lo que explica por qué los QACs y clorhexidina sólo presentan un efecto micobacteriostático (McDonnell y Russell, 1999).

En cuanto a la resistencia de las esporas, señalar que algunos biocidas a bajas concentraciones tienen efecto bactericida o bacteriostático sobre bacterias no esporuladas, incluyendo las formas vegetativas de *Bacillus* y *Clostridium*; sin embargo, el efecto esporicida necesita mayores concentraciones de los antimicrobianos, e incluso, su combinación con temperaturas elevadas, cuando se trata de QACs o clorhexidina (Shaker *et al.*, 1986; McDonnell y Russell, 1999).

Las bacterias Gram-negativas suelen ser, por lo general, más resistentes que las bacterias Gram-positivas. El papel del lipopolisacárido (LPS) como una barrera para los antimicrobianos en las bacterias Gram-negativas, ha sido ampliamente estudiado (Ayres *et al.*, 1998; McDonnell y Russell, 1999; Denyer y Maillard, 2002; Fraud *et al.*, 2003; Stickler, 2004; SCENIHR, 2009): el LPS previene el acceso de moléculas hidrofóbicas al fosfolípido y por lo tanto al interior celular. Las bacterias que presentan mayores niveles de resistencia a los biocidas son *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Proteus* spp. y *Providencia stuartii* (McDonnell y Russell, 1999). En el caso de los pseudomonads, el elevado contenido en Mg (que produce uniones fuertes entre las moléculas de LPS) y el pequeño tamaño de las porinas, son las responsables de su elevada resistencia (McDonnell y Russell, 1999).

En las bacterias Gram-positivas, la pared celular está principalmente compuesta por peptidoglicano y ácidos teicoicos. Estos compuestos parecen no tener actividad frente al paso de biocidas, observándose una rápida entrada de compuestos de elevado peso molecular en estafilococos y *Bacillus* spp., lo que explicaría la gran sensibilidad de estos organismos a los agentes antimicrobianos, especialmente a QACs y clorhexidina (McDonnell y Russell, 1999). Comentar el crecimiento especial de *S. aureus* en forma mucoide, que le aporta mayor resistencia a la entrada de

antimicrobianos y disminución de las interacciones con los biocidas; la eliminación de la mencionada capa mucoide mediante lavado, le devuelve el carácter sensible (McDonnell y Russell, 1999)

La capacidad de formar biopelículas es también un mecanismo de resistencia muy estudiado. Esta disposición provoca dificultades para el acceso del antimicrobiano al interior celular, además, induce la producción de enzimas degradativas, promueve cambios genéticos en las células de la biopelícula e impulsa interacciones químicas entre la biopelícula y el antimicrobiano (McDonnell y Russell, 1999).

La presencia de bombas de exporte es otro mecanismo muy ampliamente descrito en la literatura, al disminuir la concentración intracelular de los compuestos antimicrobianos.

Encontramos también, la capacidad enzimática para transformar los biocidas, relacionado con los metales pesados, los parabenos, los aldehídos y otros compuestos (SCENIHR, 2009). La bio-degradación medioambiental de varios compuestos se ha descrito en pseudomonads, aunque la degradación de biocidas a las concentraciones normalmente usadas, todavía es un tema que no tiene resultados concluyentes.

#### *MECANISMOS DE RESISTENCIA ADQUIRIDA*

La resistencia adquirida a biocidas puede responder a mutaciones (McMurry *et al.*, 1999) o a la adquisición del material genético en forma de plásmidos o transposones (Paulsen *et al.*, 1993; Russell, 1997, McDonnell y Russell, 1999; Ortega-Morente *et al.*, 2013).

En referencia a las *Enterobacteriaceae*, los plásmidos pueden transportar genes de resistencia a antibióticos y a metales pesados, como por ejemplo, la resistencia mediada por plásmidos a las sales de plata, muy utilizadas en el ambiente hospitalario para la prevención de infecciones en quemados (Ortega-Morente *et al.*, 2013). Se conoce también el efecto del plásmido RP1, que modificó la resistencia de *P. aeruginosa* a hexaclorofeno (McDonnell y Russell, 1999).

Tabla 7.- Mecanismos de resistencia bacteriana a biocidas (SCENIHR, 2009).

Mecanismo	Naturaleza	Nivel de susceptibilidad a otros biocidas	Resistencia cruzada
Permeabilidad	Intrínseca- Adquirida	No	Si
Exporte	Intrínseca- Adquirida	Baja	Si
Degradación	Adquirida/ Intrínseca	Baja	No
Cambios en la diana	Adquirida	Baja	No (pero sí con antibióticos)
Cambios fenotípicos	Tras exposición repetida	Baja	Si
Inducción (respuesta al estrés)	Tras exposición repetida	Variable	Si

*Permeabilidad:*

Hay muchos estudios que sugieren que los cambios en la permeabilidad son debidos a mecanismos adquiridos, especialmente en bacterias Gram-negativas (McDonnell y Russell, 1999), incluyendo cambios en la hidrofobicidad de la superficie, modificaciones en las ultraestructuras de la membrana externa, alteraciones en la composición de proteínas de la membrana externa y cambios en la composición en ácidos grasos de la membrana externa (Ortega- Morente *et al.*, 2013).

*Cambios en la diana:*

A diferencia de los antibióticos, que presentan dianas específicas de acción dentro de las células, los biocidas pueden actuar frente a varios componentes, lo que implica que las mutaciones en las dianas de acción son muy poco frecuentes en lo que se refiere a la tolerancia a biocidas (McDonnell y Russell, 1999; Ortega- Morente *et al.*, 2013). La excepción se presenta con el triclosán, ya que en *E. coli* la resistencia viene mediada por mutaciones en el gen *fabI*, que codifica para una proteína reductasa transportadora de enoil-acil, mediadora de la biosíntesis de ácidos grasos.

*Exporte:*

El mecanismo consiste en evitar que el antimicrobiano penetre dentro de la célula, para lo que se desarrolla un mecanismo que exporta al medio extracelular el compuesto, sin que éste pueda alcanzar su diana.

Actualmente, se conoce un gran número de membranas integrales y proteínas asociadas a membrana con acción en el transporte de antibióticos, biocidas u otras sustancias al exterior celular (Poole, 2005; 2007; Lubelski *et al.*, 2007; Ortega-Morente *et al.*, 2013), que están divididas en cinco familias (Figura 6):

- Transportadores primarios que utilizan la hidrólisis del ATP, llamados Superfamilia ABC (ATP Binding Cassettes)
- Transportadores secundarios que obtienen la energía de gradientes electromecánicos trans-membrana, a partir de los protones para las familias RND (Resistance Nodulation Division), MFS (Major Facilitator Superfamilia), SMR (Small Multidrug Resistance), o de los iones de Na<sup>+</sup> para la familia MATE (Multidrug and Toxic compound Extrusion)

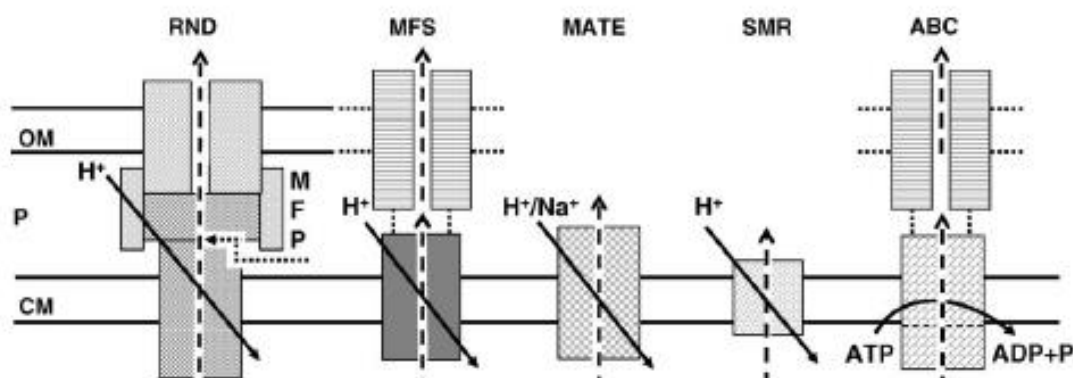


Figura 4.- Superfamilias de las bombas de exporte (Lynch, 2006).

OM: Membrana externa;

P: Periplasma;

CM: Membrana citoplasmática;

MFP: Proteínas de Fusión a Membrana

### LA SUPERFAMILIA ABC

A esta familia pertenecen los transportadores dependientes de la hidrólisis de ATP. Son transportadores de tipo ABC el sistema LmrA de *Lactococcus lactis* y EfrAB de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* (Lee *et al.*, 2003b; Valenzuela *et al.*, 2013; Lavilla-Lerma *et al.*, 2014).

### SUPERFAMILIA MFS



Los transportadores MFS son dependientes de la fuerza protón motriz. Dentro de esta familia se han identificado varias superfamilias implicadas en el transporte de fármacos. A dos de ellas, DHA12 (con 12 segmentos transmembrana, TMS) y DHA14 (con 14 TMS) pertenecen los sistemas Qac y NorA de *S. aureus* TetA, EmrB, MdfA y MdtD de *E. coli*, y LmrP y Bmr de *L. lactis* y *Bacillus subtilis* (Bolhuis *et al.*, 1995).

#### FAMILIA SMR

Esta familia contiene una serie de pequeñas proteínas con 4 segmentos transmembrana (TMS), que acopladas al potencial de membrana, expulsan antimicrobianos.

En las bacterias Gram-negativas, los genes *qacE*, *qacEΔ1*, *qacF*, *qacG* de la familia SMR codificados por plásmidos, se asocian con la protección contra los QACs. De éstos, el gen *qacEΔ1* se encuentra ampliamente distribuido en *Pseudomonas* sp., *P. aeruginosa*, *P. stuartii*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Vibrio* spp., *Campylobacter* spp., *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Aeromonas* spp., *Proteus vulgaris*, etc. (Ortega- Morente *et al.*, 2013).

Tenemos también dentro de esta familia, las bombas de exporte EmrE de *E. coli*, que aporta protección frente a QACs (Yerushalmi *et al.*, 1995), y la bomba CepA cromosómicamente codificada, que confiere resistencia a clorhexidina en *Klebsiella pneumoniae* (Fang *et al.*, 2002).

Por otro lado, se ha visto también como MFS (QacA/B) y SMR (QacC/D, QacEΔ1, QacG, QacH, QacJ) codificados por plásmidos, están envueltos en el exporte de QACs en bacterias Gram-positivas, especialmente en *S. aureus*, y *qacA/B* en el género *Enterococcus* (Bischoff *et al.*, 2012). Así, el gen *qacA*, localizado en plásmidos o cromosomas (Paulsen *et al.*, 1997; Mitchell *et al.*, 1998) confiere resistencia a un gran número de cationes orgánicos, incluyendo etidio, benzalconio y cetrimida y cationes divalentes como clorhexidina y pentamidina (Ortega- Morente *et al.*, 2013). El gen *qacB*, localizado también en plásmidos, confiere protección frente a cationes orgánicos monovalentes, y a bajo nivel, a algunos divalentes. Destacar que los genes *qacA* y *qacB* son muy parecidos y tienen sólo 7 pares de bases diferentes, lo que resulta en sólo un aminoácido diferente. Por otro lado, el gen *qacC*, localizado en plásmidos, es idéntico a *qacD*, *ebr* o *smr*, y confiere resistencia a QACs y bromuro de etidio (Ortega- Morente *et al.*, 2013) (Tabla 8).

Tabla 8.- Genes *qac* y sus resistencias (Hernández- Rodríguez, 2006).

Determinante de resistencia	Localización genética	Resistencia
<i>qacA</i>	Familia pSK1 de plásmidos multirresistentes, $\beta$ -lactamasas y familia de resistencias a metales pesados.	QACs, sales de clorhexidina, diaminas, acridinas, bromuro de etidio.
<i>qacB</i>	$\beta$ -lactamasas y plásmidos de resistencia a metales pesados.	QACs, acridinas, bromuro de etidio.
<i>qacC</i>	Plásmidos pequeños (<3kb) o grandes conjugativos.	Algunos QACs, bromuro de etidio.
<i>qacD</i>	Plásmidos grandes conjugativos (>50kb), plásmidos de multirresistencia.	Algunos QACs, bromuro de etidio.

### SUPERFAMILIA RND

De esta superfamilia, sólo una de las familias participa en el transporte de fármacos. A ella pertenecen la mayoría de los transportadores de las bacterias Gram-negativas: AcrB, AcrD, MdtB y MdtC de *E. coli*; MexB, MexD, MexF, mexY y MexK de *P. aeruginosa* entre otros.

En las bacterias Gram- negativas, para que el transporte sea efectivo es necesario atravesar la membrana citoplasmática, el espacio periplásmico y la membrana externa, efecto que se consigue con un bombeo multicomponente constituido por tres proteínas: una proteína transportadora (RND), una proteína de fusión de membrana (MFP) y una proteína en la membrana externa (OMF). Estas proteínas se caracterizan por poseer 12 TMS y estar acopladas a potenciales de membrana.

El sistema de tres componentes AcrAB-TolC relativo a la familia RND está muy disseminado en bacterias Gram-negativas y es el responsable de conferir tolerancia a un amplio rango de biocidas, como son QACs, clorhexidina, triclosan, cetrimida y plata, así como a antibióticos utilizados en la clínica (Poole, 2005; 2007; Ortega- Morente *et al.*, 2013). Otra familia RND importante implicada en la protección al triclosan son SmeDEF en *Serratia maltophilia*, MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexJK en *P. aeruginosa* y CmeABC, CmeDEF en *Campylobacter jejuni*. En *E. coli* tenemos la bomba de exporte OqxAB, que reduce la susceptibilidad a cloruro de benzalconio, triclosan, cetrimida y clorhexidina (Ortega- Morente *et al.*, 2013).

Las bombas de exporte de la familia RND están implicadas también en la resistencia a metales pesados, especialmente en el caso de las bacterias Gram-positivas, como *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae*, *L. lactis*, *B. subtilis* (Ortega- Morente *et al.*, 2013).

#### *FAMILIA MATE*

Estas proteínas constan de 12 TMS, y las pocas que se han caracterizado en procariotas funcionan intercambiando moléculas de sustrato por iones Na<sup>+</sup>. A esta familia pertenecen NorM de *Vbrio*.

#### *La inducción de la respuesta*

Muchos estudios tratan la inducción de diversos mecanismos de resistencia tras la exposición a bajas concentraciones de un biocida, como mecanismos de respuesta de la bacteria al estrés, dando como resultado la sobre- expresión de bombas de exporte, la sobre-expresión de sistemas multigénicos o la producción de guanosina-5-difosfato-3-difosfato (ppGpp) (regulador de la expresión génica) (SCENIHR, 2009).

Podemos citar como la exposición de *Salmonella typhimurium* al triclosan, deriva en la sobre-expresión de la bomba de exporte AcrAB-TolC (Webber *et al.*, 2008, SCENIHR, 2009); o como *P. aeruginosa* cuando se expone a diversos biocidas promueve una reorganización de sus procesos metabólicos (Abdel- Malek *et al.*, 2002); o como en *S. enterica* se produce la expresión de enzimas detoxificantes cuando se expone a biocidas oxidantes, (Randall *et al.*, 2007); o como *E. coli* cuando se trata con PHMB induce alteraciones en la transcripción de genes envueltos en la reparación de los ácidos nucleicos (Allen *et al.*, 2006).

#### **3.1.6.- LOS BIOCIDAS EN LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS**

Los biocidas son usados ampliamente en la industria alimentaria, para la desinfección de las plantas de producción, los contenedores de alimentos, el control del crecimiento de microorganismos en bebidas y alimentos y la descontaminación de carcasas (SCENIHR, 2009).

Los biocidas también pueden usarse como conservantes de los alimentos, para lo cual hay que recurrir al Reglamento (CE) 1333/ 2008 del 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios y sus posteriores modificaciones.

En lo que se refiere al uso en la ganadería, hay que mantener un equilibrio entre la protección de los animales de enfermedades y la salud humana. La Directiva 98/8/EC y su posterior corrección, pretende regular el uso de estos agentes, lo que ha llevado a las autoridades de los distintos países a crear listas de productos autorizados. El uso de los biocidas como conservantes de los alimentos de animales con el fin de protegerlos de infecciones alimentarias, vienen recogidos en la legislación como “Aditivos tecnológicos” bajo el Reglamento 1831/ 2003 sobre el uso de aditivos en la nutrición animal. El uso de los biocidas en la alimentación animal, debe ser aprobado por la Comisión europea, tras una evaluación a cargo de la EFSA. La mayoría de los productos autorizados son ácidos orgánicos que se adicionan a los alimentos o a los silos, para reducir la carga microbiana total.

Los biocidas pueden ser también utilizados para la limpieza de las ubres de las vacas productoras de leche y para la descontaminación de las piscifactorías, siempre que se cumplan los requisitos aprobados por la Directiva 98/8/EC.

Sin embargo, no debe olvidarse, que el uso de los biocidas en la producción animal, puede producir la aparición de residuos de éstos en los alimentos, por lo que todos los antimicrobianos utilizados deben pasar un periodo de evaluación antes de su uso, que incluye la evaluación de la aparición de residuos y los efectos sobre la microbiota intestinal (SCENIHR, 2009).

### **3.2.- Los antibióticos**

El primer antibiótico, la penicilina, fue descubierto por Alexander Fleming en 1928 (Figura 5), aunque pasaron muchos años hasta que la penicilina se utilizó en medicina, hecho que se atribuye a Ernest Chain, un farmacéutico australiano quien la usó como tratamiento de infecciones bacterianas en la II Guerra Mundial, estableciendo el punto de partida de una nueva era en el desarrollo y prescripción de antibióticos (Chroma y Kolar, 2010).

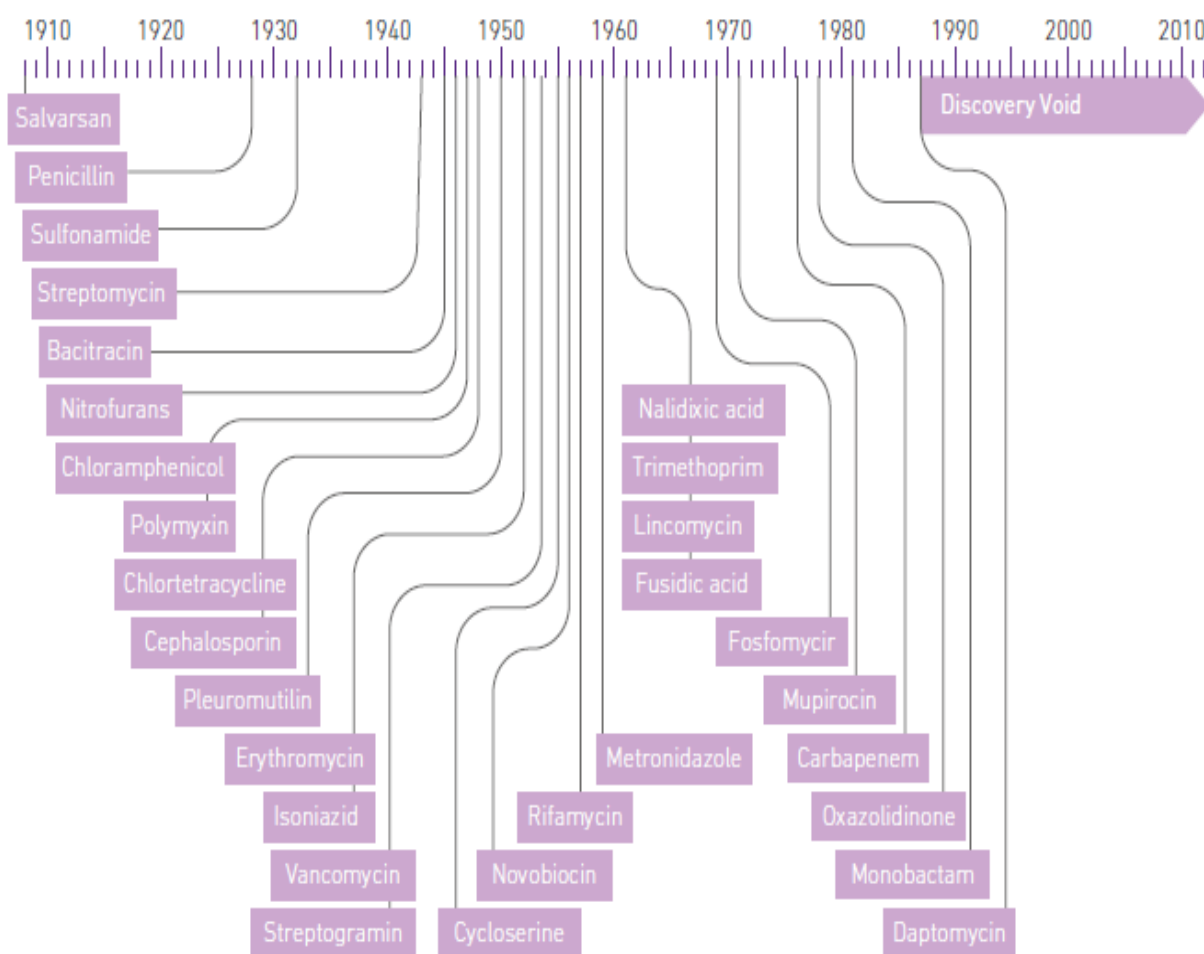


Figura 5.- Fechas del descubrimiento de los distintos antibióticos (WHO, 2014).

La primera definición de antibiótico fue dada por Waksman en 1941 (Clardy *et al.*, 2009), según la cual, los antibióticos son pequeñas sustancias químicas producidas por microorganismos que tienen la propiedad de inhibir o destruir otros microorganismos (Clardy *et al.*, 2009). Actualmente se entiende por antibióticos a toda sustancia, normalmente de bajo peso molecular, producida por seres vivos (antibióticos naturales) o modificados artificialmente a partir de ella (antibióticos semisintéticos), que a pequeñas concentraciones tienen efecto antimicrobiano (microbicida o microbiostático), tras ser administrados por vía adecuada a un organismo receptor. Por tanto, los antibióticos son compuestos relativamente sencillos, producidos por bacterias u hongos que atacan específicamente a las bacterias, al interferir en algún paso del metabolismo donde encuentran una diana adecuada.

Desde que la penicilina fue introducida de manera estable en la clínica, un mundo de sustancias ha sido aislado o sintetizado, permitiendo atacar las bacterias de manera directa. Sin embargo, estos avances se han visto ensombrecidos por el tiempo por dos razones:

- los mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias.
- las relaciones entre los distintos antimicrobianos.

### 3.2.1.- Tipos de antibióticos

Los antibióticos se agrupan de acuerdo a su diana de acción aunque no compartan una estructura química similar. Se observan tres tipos de efectos cuando se añade un agente antimicrobiano a un cultivo bacteriano en fase exponencial de crecimiento: bacteriostático, bactericida (Figura 8) y bacteriolítico.

- Se observa un efecto *bacteriostático* cuando inhibe el crecimiento pero las células no mueren: los agentes bacteriostáticos son inhibidores de la síntesis de proteínas y actúan uniéndose a los ribosomas. Dicha unión no es una unión fuerte y, cuando disminuye la concentración del agente, el antimicrobiano se libera de los ribosomas y se reanuda el crecimiento.

- Los agentes *bactericidas* matan las células pero no dan lugar a la lisis o rotura. Los agentes bactericidas son una clase de agentes químicos que generalmente se unen fuertemente a sus dianas celulares de acción y no se eliminan por dilución.

- Los agentes *bacteriolíticos* provocan la muerte celular por lisis. La rotura celular se detecta por un descenso en el número de células o en la turbidez, después de que se haya añadido el agente. Dentro de los agentes bacteriolíticos se incluyen los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular, como la penicilina y los compuestos químicos que lesionan la membrana citoplasmática.

### 3.2.2.- Mecanismos de acción de los antibióticos

La sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos y otros agentes quimioterapéuticos varía entre los distintos grupos. Las Bacterias Gram-positivas son generalmente más sensibles a los antibióticos que las Gram-negativas, aunque algunos antibióticos solo actúen frente a bacterias Gram-negativas. Por otro lado, un antibiótico que actúe tanto frente a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas se denomina antibiótico de amplio espectro.

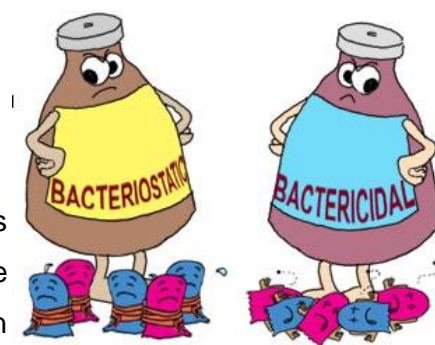


Figura 6.- Efecto bacteriostático y bactericida.  
(<http://amrls.cvm.msu.edu>)

Los antibióticos y otros agentes quimioterapéuticos pueden agruparse según su estructura química o su mecanismo de acción (Figura 7). En bacterias, las dianas importantes para la acción de los antibióticos son la pared celular, la membrana citoplasmática, la biosíntesis de las proteínas y la síntesis de ácidos nucleicos.

1.- Inhibición de la Síntesis de la Pared Bacteriana: Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (las penicilinas, las cefalosporinas y las cefamicinas) son potentes inhibidores de la pared celular. Las cefalosporinas tienen el mismo mecanismo de acción que las penicilinas, pero difieren estructuralmente en que las penicilinas tienen un anillo tiazolidínico de 5 átomos y las cefalosporinas tienen un anillo dihidiazínico de 6 átomos.

2. Alteración de la Membrana Citoplasmática: La membrana tiene una estructura bien característica e impide la entrada o salida de sustancias del citoplasma, retiene los metabolitos intracelulares, expulsa los productos de desecho, permite el transporte de sustancias, hace que la célula capte los nutrientes necesarios y que conserve una composición iónica intracelular constante e independiente de las concentraciones extracelulares. Por ello, la alteración de la membrana bacteriana modifica procesos vitales de manera irreversible para el microorganismo.

Algunas moléculas de antibióticos poseen un extremo liposoluble y otro hidrosoluble; cuando esta molécula llega a la membrana se inserta entre la capa lipídica y la de proteínas, produciendo una abertura entre estas capas conduciendo a la ruptura de la membrana.

3. Inhibición de la Síntesis Proteica: Muchos antibióticos inhiben la síntesis de las proteínas interaccionando con el ribosoma. Estas interacciones son muy específicas y muchas implican al ARNr. La estreptomicina inhibe la iniciación de la cadena proteica, mientras que la puromicina, el cloranfenicol, la cicloheximida y la tetraciclina inhiben la elongación. Aun cuando dos antibióticos inhiban el mismo paso en la síntesis de proteínas, los mecanismos de inhibición pueden ser muy diferentes.

4. Alteración de la Síntesis de Ácidos Nucleicos: Desde hace mucho tiempo se conocen compuestos con mecanismo de inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos pero la mayoría de los inhibidores de la replicación del ADN se unen con éste de forma irreversible y son muy tóxicos para su utilización clínica.

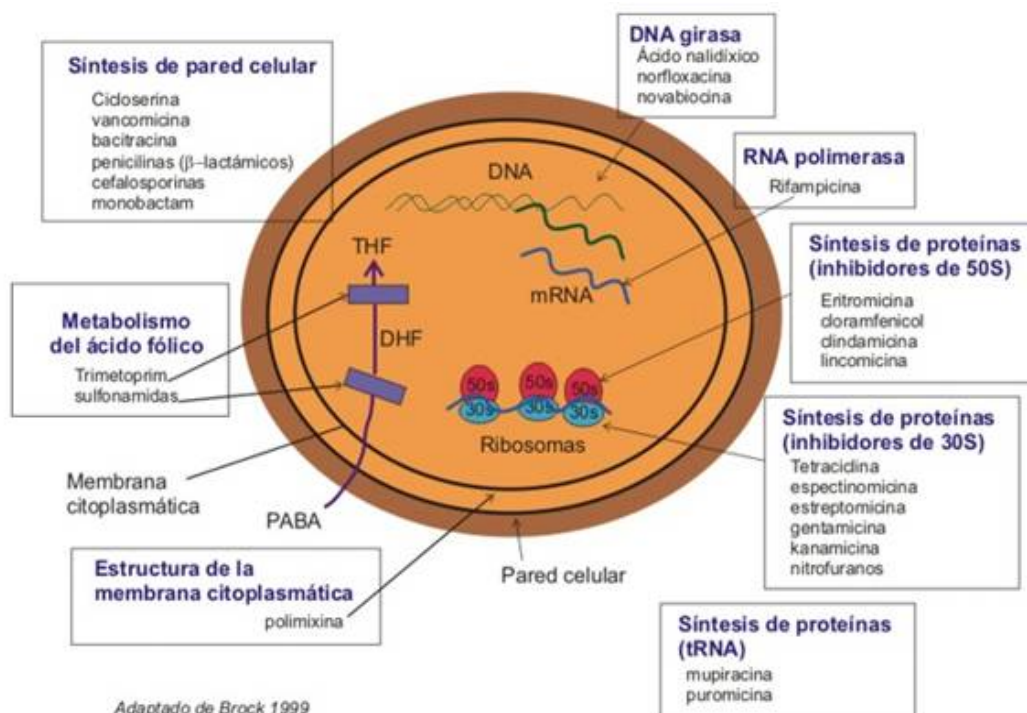


Figura 7.- Tipos de antibióticos y su mecanismo de acción (Madigan *et al.*, 2004).

### 3.2.3.- Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos se define como la capacidad de una bacteria de resistir la inhibición de un antibiótico. La resistencia puede ser intrínseca o adquirida, como ya se ha comentado.

La adquisición de los mecanismos de resistencia puede ser originada por el propio microorganismo, debido a errores en su replicación, como podrían ser la presencia de mutaciones difundidas horizontalmente de célula madre a hija, o verticalmente, de una célula a otra; o por la adquisición de material genético que codifica genes de resistencia.

Se conocen tres mecanismos de transferencia del material genético:



- La conjugación: transferencia de genes entre dos células que están en contacto. La transferencia se produce mediante plásmidos, que se pueden integrar o no en el cromosoma.
- La transducción: adquisición del material genético por la acción de un bacteriófago, que permite a la bacteria adquirir una cantidad relativamente pequeña (40 kb) de ADN.
- La transformación: la bacteria adquiere el ADN directamente del medio ambiente en circunstancias favorables a partir de otra bacteria que ha liberado su material genético.

#### 3.2.4.- *Mecanismos bioquímicos de resistencia bacteriana*

Los mecanismos básicos mediante los cuales una bacteria puede expresar resistencia a antibióticos son:

- Modificación de la diana sobre la cual actúa el antibiótico: mutaciones en la diana, producción de modificaciones en la estructura.
- Modificación, alteración o desactivación del antibiótico: un ejemplo muy conocido son las  $\beta$ -lactamasas, quienes interaccionan con los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y los inactivan (Majiduddin, 2002).
- Disminución de la cantidad de antibiótico que puede acceder a la diana por problemas de permeabilidad, secuestro del antibiótico o eliminación del antibiótico.
- Bomba de exporte de antibióticos: las bombas de exporte, son proteínas de transporte transmembranal usadas en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas para expulsar de la célula metabolitos y sustancias tóxicas (Visto anteriormente).

La disponibilidad de los antibióticos para el tratamiento de infecciones ha revolucionado el mundo de la medicina, al aumentar significativamente la calidad y la esperanza de vida humana, así como la salud y el bienestar animal. Sin embargo, las bacterias causantes de enfermedades reaccionan ante los antibióticos, volviéndose resistentes. Este natural proceso de adaptación, conlleva a un acortamiento de la esperanza de vida de los antibióticos, al favorecer la emergencia y diseminación de bacterias resistentes, encontrándonos actualmente con infecciones difíciles o incluso imposibles de tratar (WHO, 2012).

Este panorama se debe principalmente a dos factores:

- Un inapropiado uso de medicamentos en salud humana y animal.
- Deficientes medidas para controlar la diseminación de las infecciones.

Las resistencias a los antibióticos hacen difícil y encarecen los tratamientos de una gran cantidad de infecciones e, incluso en algunos casos, se produce la incapacidad de aportar un tratamiento efectivo. Las consecuencias de las resistencias son el aumento de la morbilidad, aumento del tiempo de tratamiento, aumento del riesgo de complicaciones y una elevada tasa de mortalidad. Además, económicamente, se produce un aumento de los costes de diagnóstico y tratamientos (WHO, 2012).

### 3.2.5.- Principales grupos de antibióticos

#### *Inhibición de la Síntesis de la Pared Bacteriana*

##### a) $\beta$ -lactámicos

##### *Estructura y clasificación*

El nombre de la familia de los  $\beta$ -lactámicos se explica por la presencia del anillo  $\beta$ -lactámico en su estructura. Es un compuesto que se ha ido modificando con el tiempo, lo que le ha permitido ir ampliando su espectro de acción con los años, aunque la progresiva aparición de resistencias ha limitado su uso y eficacia en determinadas situaciones. Su espectro de acción se centra en bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y espiroquetas.

La unión de éste anillo a diversas moléculas, origina las diferentes clases descritas dentro de la familia (Figura 8) (penicilinas, inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, cefalosporinas, monobactamasas y carbapenemes) y condiciona su espectro de acción y sus propiedades farmacocinéticas.

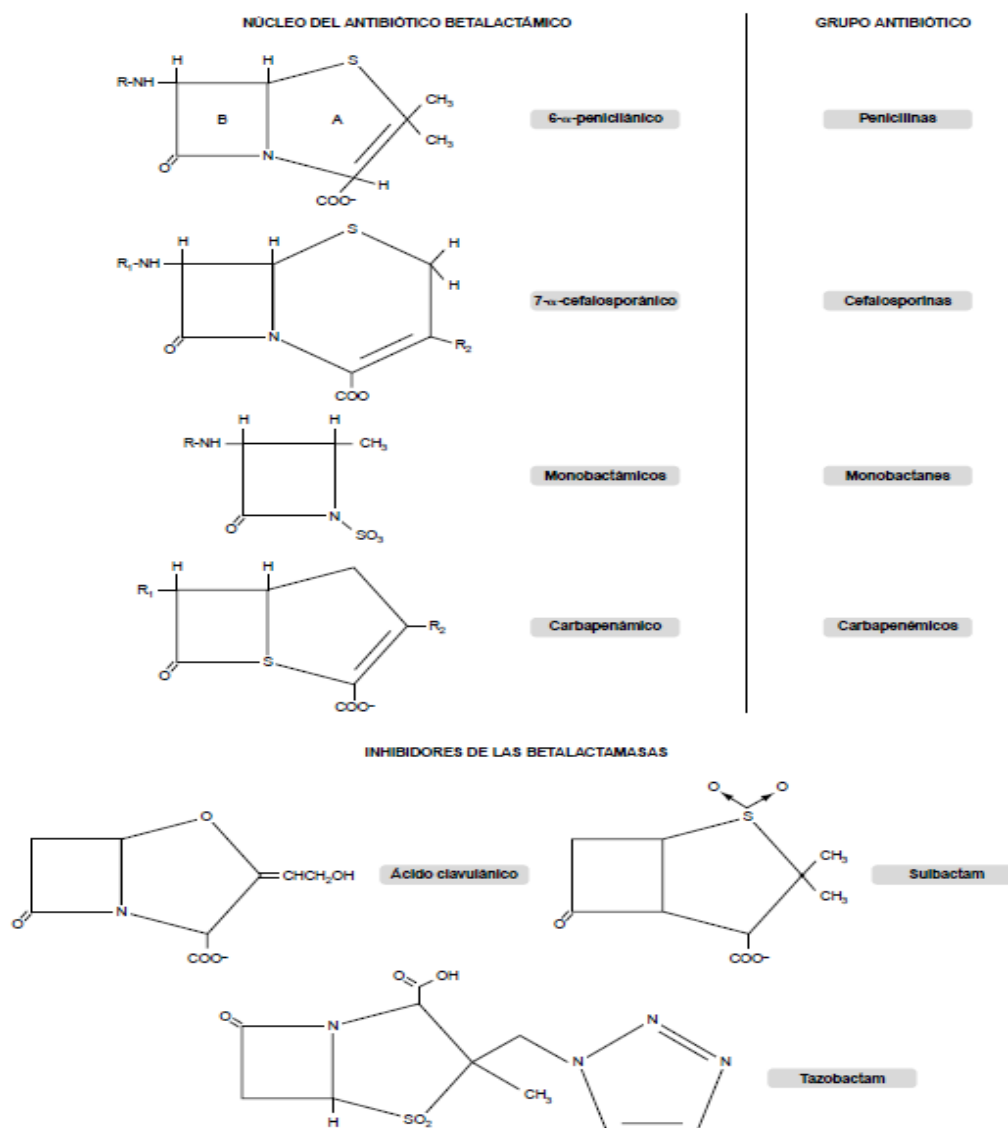


Figura 8.- Estructura de los betalactámicos (Marín y Gudiol, 2003).

Penicilinas: Todas tienen básicamente la estructura del ácido 6-aminopenicilánico, es decir, un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico. Las diferentes penicilinas difieren en las sustituciones en la posición 6 del anillo, lo que les proporciona distintas capacidades antibacterianas.

Cefalosporinas: Son productos derivados de la fermentación de *Cephalosporium acremonium*. Similares a las penicilinas en relación a la estructura y modo de acción, se componen del ácido 7- aminocefalosporánico, formado por un anillo  $\beta$ -lactámico fusionado con un anillo dihidrotiazino. Las modificaciones en la posición 7 del ácido 7- aminocefalosporánico están asociados a modificaciones en su actividad antibacteriana. A este grupo

pertenecen calmidazolium y cefuroxima, entre los antibióticos con los que hemos trabajado.

Se definen cuatro generaciones de cefalosporinas: las cefalosporinas de primera generación son muy activas frente a cocos Gram-positivos; las sucesivas generaciones, han ido perdiendo parte de ésta actividad en beneficio de los bacilos Gram-negativos. Sin embargo, todas comparten su inactividad frente a enterococos, estafilococos resistentes a meticilina y listeria.

Carbapenemes: Son los betalactámicos con mayor espectro de actividad. El imipenem, producido por *Streptomyces* spp. fue el primer compuesto en sintetizarse. Su espectro de acción abarca a cocos Gram-positivos y enterobacterias, aunque no tiene actividad frente a *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina, enterococos resistentes a betalactámicos y algunas especies de *Pseudomonas*.

Monobactámicos: Compuestos monocíclicos derivados del ácido 3-aminomonobactámico, en que el nitrógeno del anillo  $\beta$ -lactámico se encuentra unido a un radical sulfónico que activa el núcleo. Presentan una excelente actividad frente a las bacterias Gram-negativas, pero son pocos activos frente a bacterias Gram-positivas y anaerobias.

#### *Mecanismo de acción*

Estos antimicrobianos son generalmente bactericidas que interfieren en la síntesis de la pared celular e inducen un efecto autolítico. Para que los betalactámicos actúen, es necesario que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que es cuando se sintetiza la pared celular.

Los antibióticos betalactámicos bloquean la fase final de la formación del peptidoglicano al inhibir a las enzimas que participan en la formación de éste, las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP, Penicillin Binding Proteins). El peptidoglicano, está constituido por repeticiones de N- acetilmurámico (NAM) y N- acetilglucosamina (NAG). El ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí, para formar una malla, bien directamente (Gram-negativos) o mediante un pentapéptido de glicina (Gram-positivos). Los betalactámicos inhiben esta unión, debido a la similitud de los anillos betalactámicos, con los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (D-alanina-D-alanina), por lo que la pared queda debilitada y puede romperse por cambios de presión (Marín y Gudiol, 2003, Seija y Vignoli, 2006).

Por otro lado, los betalactámicos también pueden actuar activando una autolisina, que destruye el peptidoglicano.

#### *Betalactámicos asociados a inhibidores de betalactamasas*

Los inhibidores de betalactamasas son moléculas que contienen en su estructura un anillo betalactámico, que apenas tienen actividad antibiótica, pero que presentan gran afinidad por las betalactamasas. Las betalactamasas son enzimas producidas por las bacterias que destruyen la actividad de determinados betalactámicos, dependiendo del tipo de enzima (Seija y Vignoli, 2006).

Hay tres tipos de betalactamasas: el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam. Estos inhibidores ejercen su acción destruyendo al enzima, pero a su vez, destruyéndose a sí mismos. Así consiguen que al unirse a las penicilinas o cefalosporinas, los antibióticos recuperen la actividad perdida por la producción de betalactamasas. Destacar, que las betalactamasas deben ser susceptibles al inhibidor para que la combinación sea efectiva: así tenemos como la betalactamasas de *Bacteroides fragilis* es susceptible a sulbactam, por lo tanto, la combinación ampicilina-sulbactam es adecuada; sin embargo, la betalactamasa de *Enterobacter cloacae* no es susceptible a los inhibidores, por lo que la combinación de antibióticos más el inhibidor no es útil (Seija y Vignoli, 2006).

#### *Mecanismos de resistencia*

Son diversos los mecanismos de resistencia que han desarrollado las bacterias frente a estos antimicrobianos. Además, estos mecanismos pueden presentarse solos, o combinados y su control puede ser cromosómico, plasmídico o por transposones.

a) *Modificaciones en la diana.* Como hemos visto anteriormente, para ejercer su efecto bactericida, los betalactámicos deben unirse a las PBP. Así, los cambios en las PBP implican la pérdida de afinidad de los betalactámicos por ellas, con la consiguiente pérdida de actividad. Éste mecanismo se da fundamentalmente en cocos Gram-positivos (Marín y Gudiol, 2003).

b) *La resistencia por modificación, alteración o desactivación del antibiótico.* Constituye el principal mecanismo de resistencia de los betalactámicos. Las  $\beta$ -lactamasas constituyen un grupo heterogéneo de

proteínas que hidrolizan el enlace amida del anillo betalactámico, dando como resultado un derivado sin actividad antibacteriana. Las  $\beta$ -lactamasas son codificadas por genes de localización cromosómica, plasmídica o en transposones (Marín y Gudiol, 2003).

c) *Alteraciones de la permeabilidad.* La presencia de la membrana externa en las bacterias Gram-negativas, dificulta la entrada de sustancias hidrofílicas, como son los betalactámicos.

d) *Bombas de exporte.*

*b) Glicopéptidos:*

Se trata de antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana. Inhiben la formación del peptidoglicano al formar complejos con la porción D-alanina- D-alanina del pentapéptido precursor (Seija y Vignoli 2006). También tiene capacidad para alterar los protoplastos y la síntesis de ARN.

Se diferencian la vancomicina (antibiótico obtenido originalmente de *Streptomyces orientales* posee un espectro reducido con actividad sobre bacterias Gram-positivas, incluido *Staphylococcus coagulasa* negativos resistentes a la meticilina y *Enterococcus* resistentes a betalactámicos y aminoglucósidos,) y la teicoplanina, muy similares en cuanto a estructura y espectro de acción.

Mecanismo de resistencia: el mecanismo de resistencia requiere la participación de diversos genes asociados a un transposón. Es un mecanismo muy complejo, que da como resultado un peptidoglicano que presenta un pentapéptido que culmina en D-alanina- D-lactato ó D-alanina-D-serina, incapaz de unirse a la vancomicina. Sin embargo, no se conoce el mecanismo de resistencia a la teicoplanina.

*Alteración de la Membrana Citoplasmática*

*c) Polimixinas*

Son una familia de péptidos, que se designan con las letras A, B, C, D y E. Poseen efectos tóxicos y son poco difusibles, por lo que únicamente la polimixina B y la polimixina E (colistina) se usan en clínica.

El mecanismo de acción se basa en la capacidad surfactante que tienen sobre las membranas celulares; la unión de la porción catiónica del fármaco a la porción aniónica del lipopolisacárido de las membranas celulares de las bacterias Gram-negativas, provoca un aumento de la permeabilidad de la membrana y por tanto la muerte celular.

Su actividad se restringe a las bacterias Gram-negativas, especialmente a *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*, aunque la escasa presencia de iones divalentes en ésta última, interfiere en la unión del antibiótico a la membrana bacteriana (Vademecum).

Los mecanismos de resistencia implican cambios en la composición de los fosfolípidos, de manera que los hacen menos afines al antibiótico (Molina *et al.*, 2009).

### *Inhibición de la Síntesis Proteica*

#### d) Aminoglicósidos

##### *Estructura y clasificación*

El primer aminoglicósido, la estreptomina, fue descubierto en 1943 a partir del microorganismo *Streptomyces griseus*, para luchar contra *Mycobacterium tuberculosis* (Waskaman, 1943).

Su estructura se caracteriza por poseer dos o más amino azúcares unidos glicosídicamente a un núcleo hexosas o aminociclitol, que se encuentra generalmente en posición central. Según los amino azúcares, se clasifican en diferentes familias: gentamicina, kanamicina, estreptomina y neomicina; tenemos también a la espectinomina, que no posee amino azúcares.

##### *Mecanismo de acción*

La diana de este tipo de antibióticos es el ribosoma bacteriano, al cual se unen mediante un enlace covalente irreversible. Atraviesan la membrana mediante transporte activo, y ya dentro del ribosoma se unen a la subunidad ribosómica 30S, que tiene un papel fundamental en la transducción del material genético e inhibe la síntesis de proteínas (Ramírez y Tolmasky, 2010; van Hoek *et al.*, 2011).

El espectro de acción se centra en estafilococos (a excepción de *S. aureus* y las cepas resistentes a metilina), enterobacterias y pseudomonads. Son inactivos

frente a bacterias anaerobias mientras que los enterococos presentan una resistencia intermedia.

#### *Mecanismos de resistencia*

Existen 4 mecanismos descritos

a) Alteración de la permeabilidad de la membrana, que provoca la disminución de la acumulación del antibiótico, disminución del transporte a través de la membrana interna o exporte activo (Magnet *et al.*, 2001). Este mecanismo confiere resistencia cruzada a todos los aminoglicósidos.

b) Mutaciones en la diana: adquisición de mutaciones en las proteínas de la subunidad ribosómica 30S, que disminuyen la afinidad del antibiótico por el ribosoma.

c) Desactivación del antibiótico por modificación enzimática: se producen enzimas modificadoras de aminoglicósidos dando lugar a un producto inactivo. La molécula modificada no es capaz de unirse correctamente al ribosoma, permitiendo que la bacteria sobreviva en presencia del antibiótico. Se clasifican en N-acetiltransferasas (ACCs, genes *aac(3)*, *aac(6')*), O- fosfotransferasas (APHs, genes *aph*, *strA*, *strB*) y O- adeniltransferasas (ANTs, genes *addA*, *addB* ó *ant*), dependiendo de su capacidad de fosforilación, adenilación o acetilación (Tabla 9) (Azuzena y Mobashery, 2001, de Toro- Hernando, 2013). La producción de estas enzimas es la manera más frecuente de resistencia a aminoglicósidos, y los genes responsables están localizados en transposones, plásmidos o en el cromosoma.

d) Metilación del sitio de unión del antibiótico al ribosoma, por enzimas metilasa implica la metilación post-transcripcional del ARNr con la utilización del S-adenosil-metionina como cofactor. Los aminoglicósidos producen errores de lectura en la transducción e impiden la translocación, uniéndose a un motivo altamente conservado del ARNr 16S dando como resultado alteraciones en la funcionalidad del ribosoma (Davies y Davis, 1968). La alteración por sustitución o metilación de las bases implicadas en la unión entre el ARNr 16S y los aminoglicósidos puede producir una pérdida de la afinidad por el antibiótico y resistencia al hospedador (Kotra *et al.*, 2000. Estas enzimas están codificadas por los genes *arma*, *npmA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* y *rmtD*, localizados en plásmidos (vanHoek *et al.*, 2011; de Toro- Hernando, 2013).



**Tabla 9.- Fenotipos de resistencia asociados e enzimas modificantes de aminoglucósidos (de Toro-Hernando, 2013).**

Fenotipo de resistencia	Enzima codificante
STR	APH(3'')
GEN	AAC(3)-I
KAN, AMK	APH(3')-IV
STR, APT	ANT(3'')
KAN, NEO	APH(3')-I, APH(3')-II
KAN, TOB, AMK	ANT(4')-II
KAN, GEN, TOB	ANT(2')-I
KAN, GEN, TOB, NET	AAC(3)-II, AAC(3)-IV
KAN, TOB, AMK, NET	AAC(6')-I
GEN, TOB, NET, NEO	AAC(2')

STR: estreptomina; GEN: gentamicina; KAN: kanamicina; AMK: kanamicina; SPT: espectinomina; TOB: tobramicina; NET: netilmicina; NEO: neomicina.

#### e) *Macrólidos*

Son antibióticos semi-sintéticos derivados de la eritromicina, producida por *Streptomyces erythreus*. Se clasifican según el número de carbonos, así tenemos a la eritromicina con 14 carbonos.

Mecanismo de acción: los macrólidos se unen a la subunidad 50S del ARNr de manera reversible. La unión, mediante puentes de hidrógeno se realiza entre los radicales hidroxilo de macrólidos, y determinadas bases del ARNr, lo que provoca un bloqueo en las reacciones de transpeptidación y translocación (Seija y Vignoli, 2006).

La eritromicina presenta buena actividad frente a *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Corynebacterium* spp. principalmente.

#### f) *Cloranfenicol*

El cloranfenicol es un antibiótico derivado de *Streptomyces venezuelae*, aislado por primera vez en 1947 en Venezuela (Ehrlich *et al.*, 1947). Este antibiótico tiene en su estructura una porción nitrobenzeno y es un derivado del ácido dicloroacético, que se produce sintéticamente.

### *Mecanismo de acción*

El cloranfenicol ejerce sus efectos mediante la unión y bloqueo de la peptidiltransferasa de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, hecho que impide la síntesis de polipéptidos bacterianos (Goldberg, 1965). Esto produce un efecto bacteriostático en la mayoría de los microorganismos susceptibles, aunque también es bactericida frente a muchos patógenos.

### *Mecanismo de resistencia*

El mecanismo de resistencia más frecuente de este antibiótico es la inactivación enzimática gracias a las enzimas “Cloranfenicol Acetil Transferasas, CAT”. La enzima acetila los dos grupos hidroxilo de la molécula en una reacción en la cual participa también la acetilcoenzima A (de Toro- Hernando, 2013). Los derivados formados no tienen capacidad para unirse a la subunidad 50S del ribosoma e inhibir la peptidiltransferasa (Okamoto y Suzuki, 1965). Se han encontrado dos tipos de proteínas: CatA (genes *catA1*, *catA2*) y CatB (genes *catB2*, *catB3*, *catB8*), así como proteínas que median la expulsión de cloranfenicol de la célula, como son Cml (de Toro- Hernando, 2013).

Además, se ha identificado un variado número de sistemas transportadores de drogas, como AcrAB-TolC que expulsa el cloranfenicol y florfenicol o el MdfA en *E. coli* (Lee *et al.*, 2000).

Otros mecanismos de resistencia como O-fosforilación (Mosher *et al.*, 1995) y degradación hidrolítica de cloranfenicol a p-b-nitrofenilserinol (Mosher *et al.*, 1990) o el nuevo gen de resistencia a cloranfenicol y florfenicol *cfr* (Schwarz *et al.*, 2004) son el resto de mecanismos relacionados con la resistencia al cloranfenicol.

### *g) Tetraciclina*

Los primeros miembros de esta familia fueron descubiertos a finales de los años 40. Estas moléculas eran productos de *Streptomyces aureofaciens* y *Streptomyces rimosus*.

Las moléculas de tetraciclina están formadas por un núcleo tetracíclico (cuatro anillos bencénicos) donde se unen diferentes grupos funcionales que dan lugar a las diferentes moléculas de tetraciclinas.

#### *Mecanismo de acción*

Las tetraciclinas se unen de manera irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, provocando inhibición de la síntesis de proteínas. Para llegar a la diana tienen que penetrar la pared celular a través de los poros o por un proceso de transporte. La resistencia a tetraciclina ocurre cuando disminuye la penetración o cuando se forman proteínas que protegen al ribosoma de la unión de tetraciclinas a su sitio diana.

#### *Mecanismos de resistencia*

La causa principal de resistencia a tetraciclinas es debida a la adquisición por parte de las bacterias de los genes *tet*, mecanismo que exporta la tetraciclina del interior celular, disminuyendo la concentración de la droga en el citoplasma. Así los principales mecanismos de resistencia son:

- Bombas de exporte
- Protección del ribosoma.
- Desactivación enzimática.
- Disminución de la acumulación de tetraciclinas en el interior de la bacteria, debido a alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa y sistemas de expulsión activa no específicos para tetraciclinas.
- Alteraciones en la diana de la tetraciclina.

La mayoría de los genes de resistencia a tetraciclinas están asociados a plásmidos móviles, transposones e integrones (Chopra y Roberts, 2001)

#### *h) Estreptograminas*

Pertenece al grupo de los antimicrobianos que inhiben de manera reversible la síntesis de proteínas. Como representantes tenemos a la Estreptogramina B (Quinupristina) y Estreptogramina A (Dalfopristina). Éstos se unen a la subunidad 50S del ribosoma, induciendo cambios conformacionales que inhiben la síntesis de

proteínas. El efecto sinérgico de la Quinupristina + Dalfopristina se debe a que el efecto provocado por la dalfopristina en el ribosoma, aumenta la afinidad de éste por la quinupristina..

El espectro de actividad incluye a bacterias Gram-positivas como *S. aureus* sensibles a la meticilina como las resistentes a la meticilina, *Streptococcus* y *Enterococcus faecium*, incluyendo los resistentes a la vancomicina (Escolar *et al.*, 2001).

La resistencia viene dada por la resistencia intrínseca de las bacterias Gram-negativas, debido a que su membrana externa impide la entrada de estas moléculas, y por modificaciones en la diana, debido a una metilación de la subunidad 23S ribosomal, la inactivación del fármaco mediante hidrolasas (quinupristina) o acetilasas (dalfopristina), y las bombas de exporte (que no afectan a la estreptogramina)

### *Alteración de la Síntesis de Ácidos Nucleicos*

#### i) Quinolonas

##### Estructura y clasificación

Las quinolonas son antibacterianos de origen sintético, formados por una doble estructura de anillo que contiene un residuo N en la posición 1. Diferentes sustituciones, han dado los diversos tipos de quinolonas, desde el ácido nalidíxico, descrito en 1962 (Leshner *et al.*, 1962), hasta las quinolonas fluoradas (de Toro-Hernando, 2013), clasificándose en 4 generaciones (de Toro- Hernando, 2013):

- las quinolonas de primera generación (ácido nalidíxico): con actividad sobre enterobacterias, pero inactivas frente a bacterias Gram-positivas y anaerobios.

- las quinolonas de segunda generación (norfloxacin y ciprofloxacino): incorporan un átomo de flúor y presentan mayor actividad sobre bacterias Gram-negativas. El ciprofloxacino tiene un efecto mayor sobre *P. aeruginosa*, aunque una baja actividad sobre bacterias Gram-positivas y nula sobre anaerobios.

- las quinolonas de tercera generación (levofloxacina), tienen mucho efecto sobre bacterias Gram-negativas y algo más que las demás frente a las bacterias Gram-positivas. Destacar su efecto sobre *Streptococcus*.

- las quinolonas de cuarta generación, tiene gran efecto sobre bacterias Gram-negativas y mucho más efecto que las otras sobre las bacterias Gram-positiva

s, especialmente *S. aureus* y *Enterococcus* y sobre anaerobios.

#### *Mecanismo de acción*

Actúan inhibiendo la acción de las topoisomerasas tipo II: ADN-girasas (más sensibles a las quinolonas en las bacterias Gram-negativas) y Topoisomerasa IV (más sensibles a las quinolonas en las bacterias Gram-positivas). El efecto se debe a la habilidad de las quinolonas para formar complejos con el ADN- topoisomerasas II (de Toro- Hernando, 2013).

La ADN girasa es una topoisomerasa II que posee la función de mantener un nivel de enrollamiento del ADN, que facilite el movimiento necesario en la replicación y transcripción. Ésta posee cuatro subunidades: dos GyrA y dos GyrB codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* (Hawkey, 2003). La topoisomerasa IV, separa las hebras de ADN tras cada replicación, y también posee cuatro subunidades: dos ParC y dos ParE (Hawkey, 2003). Se ha observado que la secuencia aminoacídica de GyrA y GyrB es homóloga a ParC y ParE, respectivamente, lo que explica que ambas pueden ser inhibidas por las quinolonas (de Toro- Hernando, 2013).

El mecanismo de acción de las quinolonas sobre las citadas enzimas debe tener como primer paso, la formación de un complejo quinolona-enzima-ADN (Figura 9). Ésto ocurre cuando la enzima ya ha producido extremos libres en el ADN, por lo que la unión de la quinolona forma un complejo que supone una barrera física para el movimiento, bloqueándose así la síntesis del ADN y el crecimiento celular; para la topoisomerasa IV el mecanismo no se conoce, pero se cree que es similar (de Toro- Hernando, 2013).

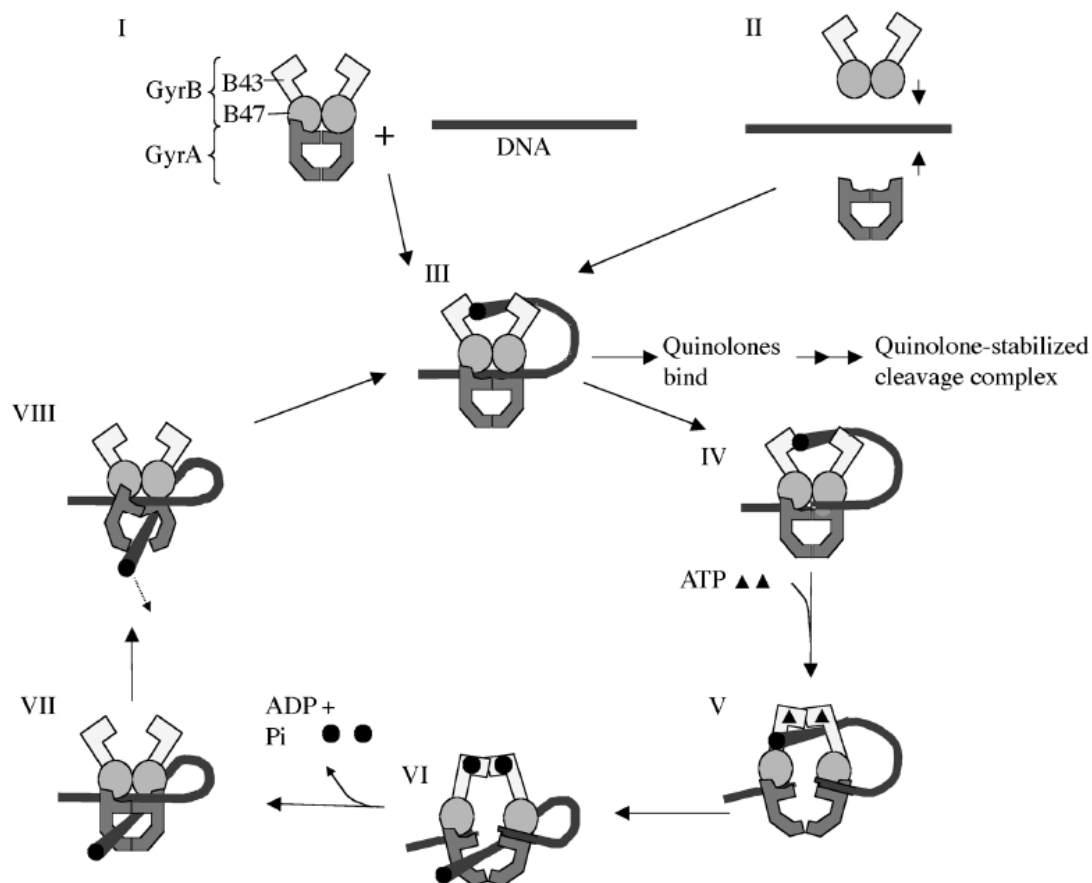


Figura 9.- Superenrollamiento de la ADN- girasa, y punto de acción de las quinolonas (Hawkey, 2003).

La resistencia a las quinolonas, resulta de la acumulación de varios mecanismos bioquímicos cooperativos, que incluyen mecanismo cromosómicos (mutaciones de las topoisomerasas diana, bombas de exporte, impermeabilización de la membrana), y mecanismos plasmídicos (protección de las dianas, modificación enzimática del antibiótico y expulsión activa del mismo) (Hawkey, 2003; Giraud *et al.*, 2006; de Toro- Hernando, 2013).

Así, en lo que se refiere a los mecanismos cromosómicos, destacar la elevada frecuencia de mutaciones en el gen *gyrA* de las bacterias Gram-negativas frente al gen *gyrB*, y que si previamente no se ha producido mutación en *gyrA*, tampoco se observará mutación en *parC* ni *parE*. Señalar también que los sistemas de expulsión activa, como son las bombas de exporte AcrAB y AcrEF, son las más relacionadas con la expulsión de estos antibióticos (Giraud *et al.*, 2006; de Toro- Hernando, 2013).

Por otro lado, al hablar de los mecanismos plasmídicos (PMQR, Plasmid Mediated Quinolone Resistance) descubiertos a finales de los años noventa con el gen *qnr* (Martínez- Martínez *et al.*, 1998), se han identificado muchos más mecanismos,

como son las proteínas Qnr, la enzima aminoglucósido acetiltransferasa AAC(6')-Ib-cr y las bombas de exporte QepA y OqxAB (Rodríguez- Martínez *et al.*, 2011; Poirel *et al.*, 2012; de Toro- Hernando, 2013). Las proteínas de tipo Qnr, actúan protegiendo a las topoisomerasas II, mientras que la acetiltransferasa AAC(6')-Ib-cr variante de la enzima AAC(6')-Ib, que confiere resistencia no sólo a kanamicina, amikacina y tobramicina, como ocurre con esta segunda, sino también a ciprofloxacino y norfloxacina (Robicsek *et al.*, 2006; Poirel *et al.*, 2012; de Toro- Hernando, 2013). Por último, las bombas de exporte QepA y OqxAB causan un incremento de hasta 5 veces la MIC de norfloxacina y ciprofloxacino e incluso se ha observado cómo la presencia de este gen viene relacionada con multirresistencias a aminoglucósidos, fluorquinolonas y betalactámicos de amplio espectro (Martínez- Martínez *et al.*, 2008; Strahilevitz *et al.*, 2009; Poirel *et al.*, 2012; de Toro- Hernando, 2013). Tras todo lo anteriormente expuesto, estos mecanismos han pasado a denominarse “mecanismos transferibles de resistencia a quinolonas” (TMQR, Transferable Mechanism of Quinolona Resistance) (Ruiz *et al.*, 2012a; Ruiz *et al.*, 2012b; de Toro- Hernando, 2013).

### *Otros mecanismos*

#### *j) Sulfamidas*

Las sulfamidas fueron las primeras drogas eficaces para el tratamiento sistémico de las infecciones bacterianas en el ser humano. Les caracteriza una estructura química similar al ácido para-aminobenzoico (PABA).

#### *Mecanismo de acción*

Las sulfamidas son análogos estructurales y antagonistas del PABA, e impiden la utilización de este compuesto para la síntesis del ácido fólico, quien a su vez actúa en la síntesis de bases nitrogenadas y aminoácidos. La acción se ejerce compitiendo por la acción de la dihidropteroato sintetasa, DHPS (Figura 12), responsable de la incorporación de PABA al ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico (Zinner y Mayer, 2000).

#### *Mecanismo de resistencia*

De entre los mecanismos de resistencia a las sulfamidas podemos destacar, la disminución de la permeabilidad, la expulsión activa y las alteraciones enzimáticas. Destacar en lo que se refiere a este último mecanismo, la producción del ácido fólico

por una vía alternativa o la hiperproducción de PABA, lo que neutraliza la competencia de las sulfamidas con los mecanismos de resistencia implicados en las sulfamidas. También se han descrito mutaciones del gen *folP* que codifica una dihidropteroato sintetasa (Skold, 2001; vanHoek *et al.*, 2011; de Toro- Hernando, 2013). A todo esto añadir, que en la resistencia están implicados los genes *sul1*, *sul2*, *sul3*, que codifican la forma resistente de la enzima DHPS (Michael *et al.*, 2006). Destacar que el gen *sul1* se encuentra ampliamente distribuido en bacterias Gram-negativas al formar parte de un integrón de la clase 1 y que el gen *sul2* se relaciona ampliamente con genes de resistencia a aminoglucósidos *strA* y *strB* (Bean *et al.*, 2009; de Toro- Hernando, 2013).

#### *k) Trimetoprima*

Es un poderoso inhibidor de la dihidrofolato reductasa bacteriana, enzima que actúa en la síntesis del ácido fólico. Es un mecanismo similar al de las sulfamidas, pero actúa en un paso posterior, ya que interfiere en la conversión del ácido dihidrofólico a ácido tetrahidrofólico (Figura 12), precursor de la síntesis del ácido fólico.

#### *Mecanismo de resistencia*

La resistencia se relaciona con múltiples mecanismos, aunque el más importante es la adquisición de manera horizontal de genes que codifican dihidrofolato reductasas diferentes de la original (*Dhfr*, *Dfr*). También se han descrito la hiperproducción de la enzima, que lleva a agotar la capacidad inhibitoria del fármaco y alteraciones de la permeabilidad celular (de Toro- Hernando, 2013).

#### *l) Rifampicina*

Según el Vademecum, la rifampicina se une a la subunidad beta de la ADN polimerasa ARN-dependiente, impidiendo a ésta la unión al ADN, lo que impide la transcripción del ARN. Destacar que la rifampicina no se une a las células eucariotas, por lo que la síntesis del ARN humano no se ve afectada.

Es el fármaco de primera elección en el tratamiento de la tuberculosis, aunque no debe utilizarse en solitario, ya que rápidamente se desarrollan resistencias a ésta.



Destacar la sensibilidad a rifampicina de diversas especies de *Mycobacterium* y *Neisseria*, así como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Legionella pneumophila*.

#### *Mecanismos de resistencia*

La resistencia viene mediada por mutaciones en el gen *rpoB* y por el exporte de la droga (de la Iglesia y Morbidoni, 2006).

Las mutaciones en el gen *rpoB*, gen codificante de la subunidad beta de la ARN polimerasa, se encuentran en una pequeña zona del gen en el que se involucran sólo 8 de los 23 aminoácidos presentes en esta región (de la Iglesia y Morbidoni, 2006).

#### *m) Nitroimidazoles*

El principal representante es el metronidazol, compuesto amebicida, bactericida y tricomonicida. Actúa sobre las proteínas que transportan electrones en la cadena respiratoria de las bacterias anaerobias, aunque en otros microorganismos inhibe la síntesis de ADN.

El espectro de actividad incluye bacterias anaerobias, y es inactivo frente a los aerobios comunes. No suele inducir resistencias.

#### *3.2.6.- Datos relevantes sobre el consumo de antimicrobianos a nivel europeo*

El uso y abuso de los antimicrobianos es uno de los factores principales del desarrollo y diseminación de resistencias a antimicrobianos. Las medidas para poder controlarlos se basan en planes para implementar un uso racional de los mismos.

El consumo de antibióticos de uso sistémico en Europa durante el año 2011 (Figura 10) varió entre 11,4 (Holanda) a 35,1 (Grecia) DDD (Dosis Diaria Definida)/ 1000 habitantes/ día, lo que sitúa una media de 19,5 DDD/ 1000 hab. / día y que la mayor proporción de los antibióticos utilizados, se da en ambiente no hospitalario (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC, 2014). El grupo más utilizado fue la combinación de penicilinas, seguido de los macrólidos y tetraciclinas; en cuanto a los antibacterianos administrados de manera oral, también se vio una gran variabilidad situándose entre 1,2 (Suecia) a 4,9 (Francia) cajas/ 1000 hab/ día, observándose una media de 2,5 paquetes/ 1000 hab/ día (ECDC, 2014).

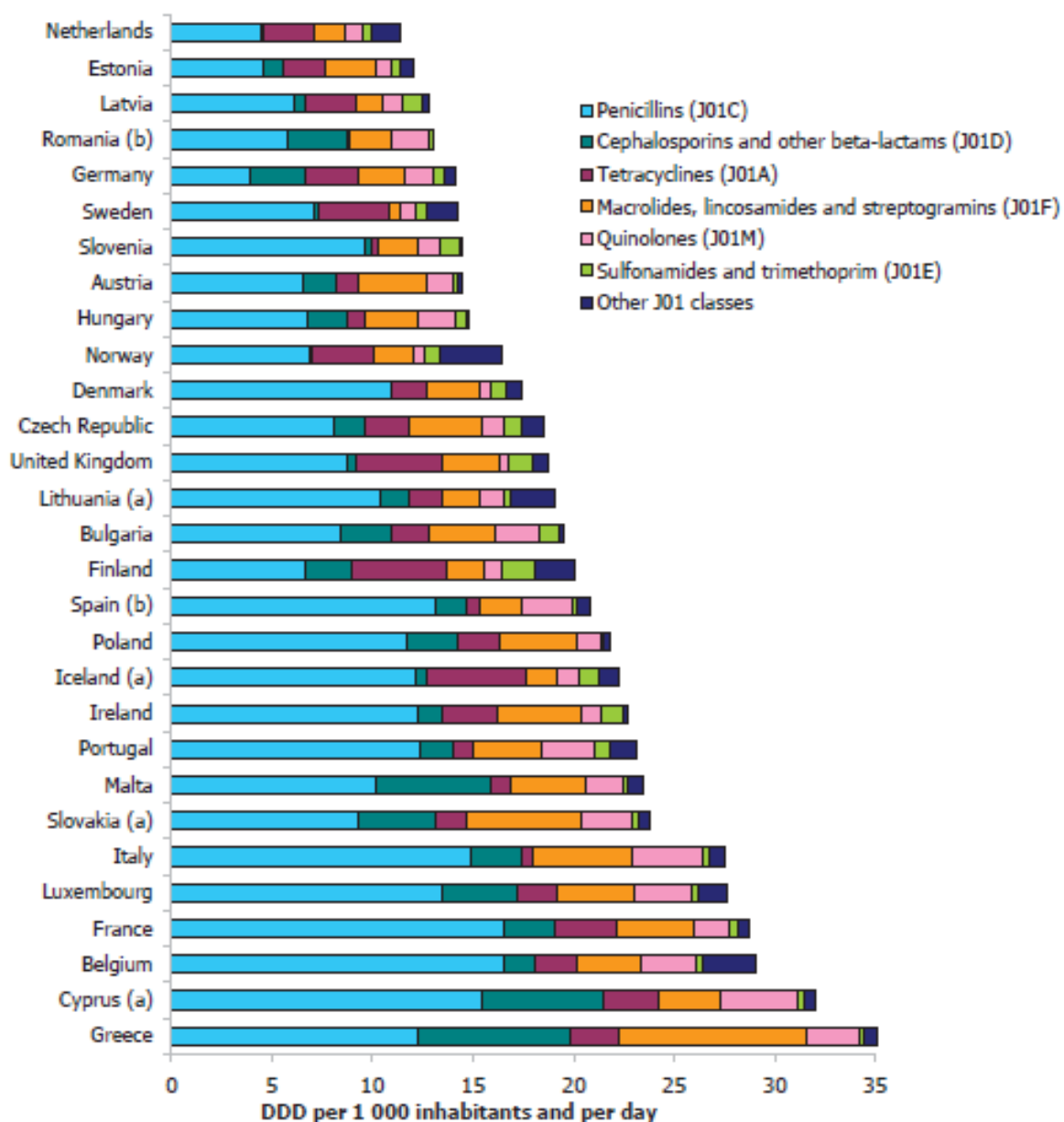
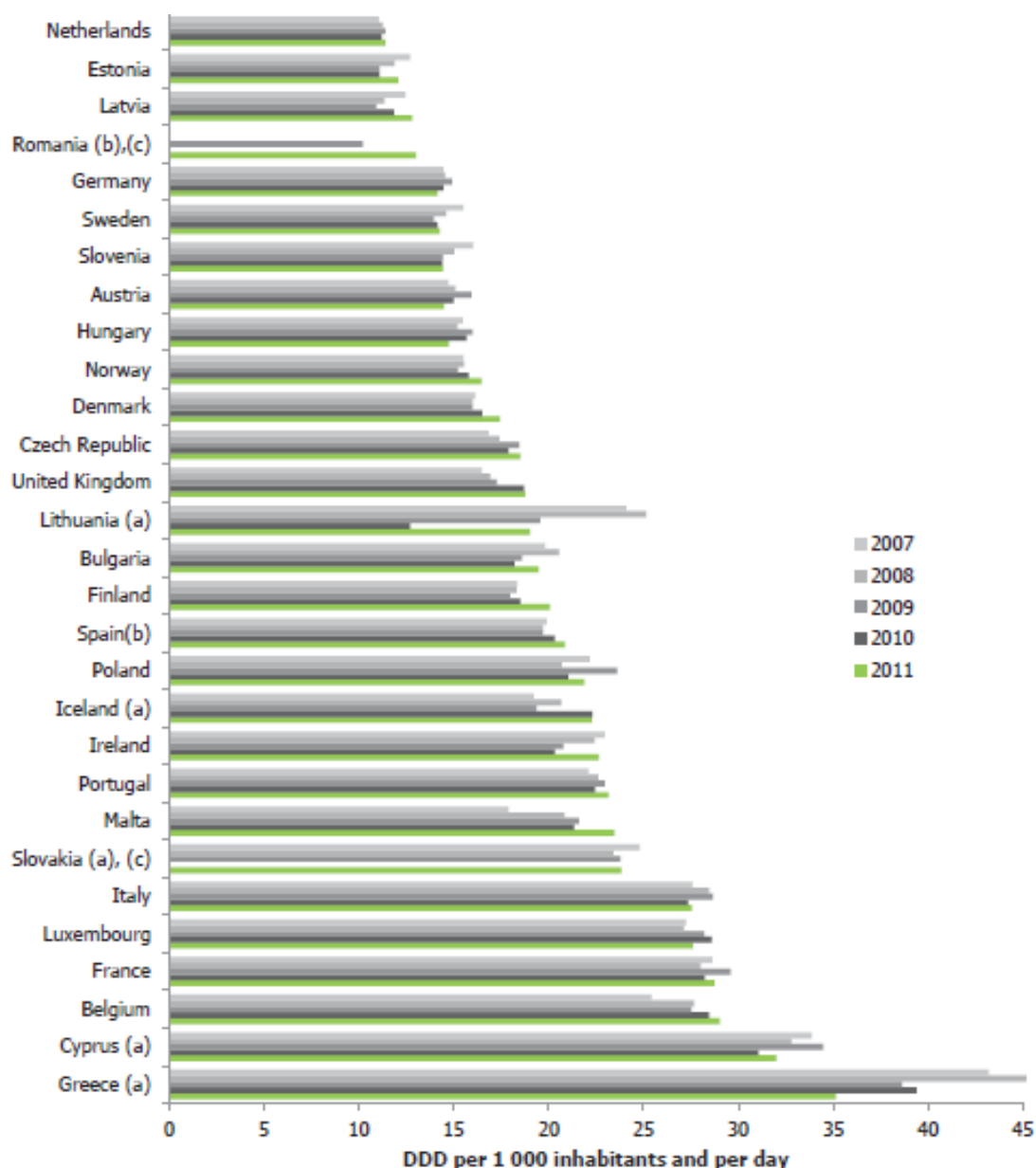


Figura 10.- Consumo de antibióticos en los países de la UE en 2011 (ECDC, 2014).

- a) Los datos incluyen el consumo hospitalario
- b) Los datos no incluyen el consumo sin prescripción médica.

En el sector hospitalario, el consumo de antibióticos varió de 1,0 DDD/ 1000 hab/ día (Holanda) a 3,2 (Rumanía) DDD/ 1000 hab/ día, siendo las penicilinas seguidas de las cefalosporinas y quinolonas los grupos más usados (ECDC, 2014).

No se ha visto un incremento significativo del consumo de antibióticos desde 2007 a 2011 en Europa a excepción de Bélgica, Malta y Reino Unido (Figura 11), pero de manera general, el consumo en 2011 fue mayor que en el año anterior (ECDC, 2014).



**Figura 11.- Tendencia del consumo de antibacterianos en los países de la UE entre 2007- 2001 expresados como DDD/ 1000hab/ día (ECDC, 2014).**

- a) Los datos incluyen el consumo en el sector hospitalario
- b) Los datos no incluyen el consumo sin prescripción médica.
- c) No hay datos de todos los años

### ***Tetraciclinas***

El consumo de tetraciclinas en la UE en 2011 (Figura 13) fue entre 0,1 (Rumanía) a 4,9 (Islandia) DDD/ 1000 hab/ día, con una media de 2,1 DDD/ 1000 hab/ día. España se situó entre 0,13 a 1,08 DDD/ 1000 hab/ día (ECDC, 2014).

En los últimos cinco años (Figura 12), se ha observado un incremento significativo del consumo de tetraciclinas en Dinamarca, España y Reino Unido,

aunque aun así, España sigue manteniéndose por debajo de la media en cuanto al consumo de estos antimicrobianos (ECDC, 2014).

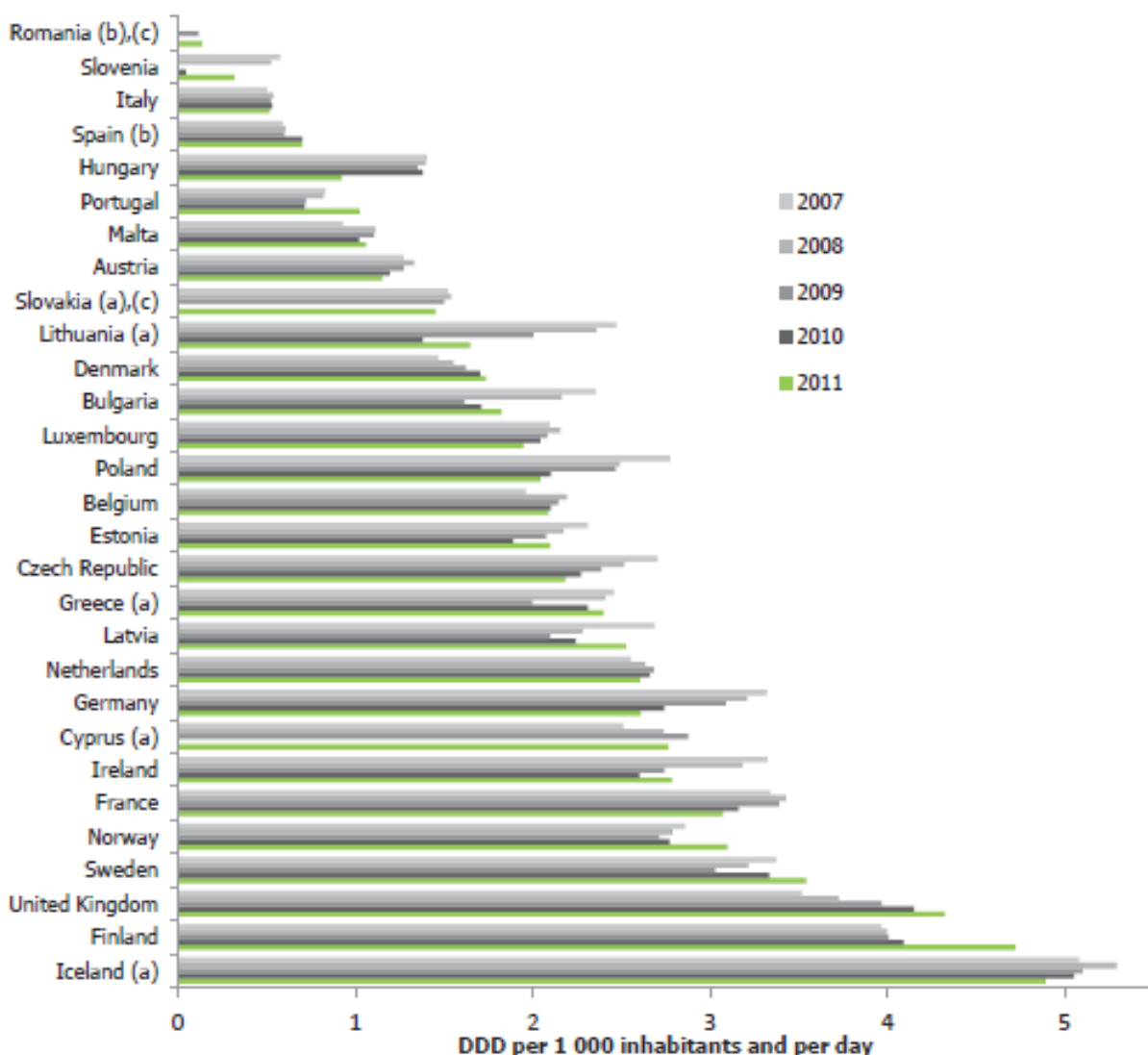


Figura 12.- Tendencia del consumo de tetraciclina en la UE entre 2007- 2011, (ECDC, 2014).

- a) Los datos incluyen el consumo hospitalario.
- b) No incluye los datos de consumo sin prescripción médica.
- c) No hay datos sobre todos los años.

### *B- lactámicos*

En todos los países de la UE, las penicilinas fueron los antibacterianos más consumidos en el año 2011 (Figura 10), observándose unas medias de consumo que variaron desde 3,9 (Alemania) hasta 15,6 (Bélgica y Francia) DDD/ 1000 hab/ día, computándose una media de 9,7 DDD/ 1000 hab/ día (ECDC, 2014). En 11 de los 29 países, las penicilinas significaron más de 50% del consumo total de antimicrobianos

en 2011. Decir además, que el grupo de las penicilinas de amplio espectro y las combinaciones de penicilinas e inhibidores de beta-lactamasas fueron los grupos más importantes. El consumo de amoxicilina se movió entre 0,9 (Suecia) a 9,2 (Francia) DDD/ 1000 hab/ día, resultando ser el antibiótico más frecuentemente consumido en los 21 países, con excepción de Dinamarca, Suecia y Noruega (ECDC, 2014).

En lo que se refiere al consumo entre 2007-2011, Bélgica, República Checa, Finlandia, Malta, España y Reino Unido han aumentado significativamente su consumo durante este periodo, y sólo ha disminuido en Alemania (ECDC, 2014).

---

#### **4.- La resistencia bacteriana en la cadena de producción de alimentos**

---

Como hemos comentado anteriormente, la resistencia a los antimicrobianos es un problema mundial que afecta tanto al hombre como a los animales, y que está derivado del mal uso de éstos (WHO, 2012, 2014).

Los antibióticos usados en la producción de alimentos responden, no sólo al uso como tratamiento en animales enfermos, sino también como preventivos de enfermedades y como promotores del crecimiento, desencadenando así un uso abusivo (WHO, 2012, 2014). El problema viene cuando estos antibióticos usados de mala manera en la producción ganadera (Figura 13), son los mismos que los utilizados en la clínica humana, lo que incrementa el riesgo de diseminación de emergencias y de bacterias resistentes, causando infecciones en el hombre y los animales (WHO, 2012, 2014). A todo esto debemos sumar el incremento en el uso de biocidas en la desinfección de superficies en la industria alimentaria y su presencia en numerosos productos del día a día.

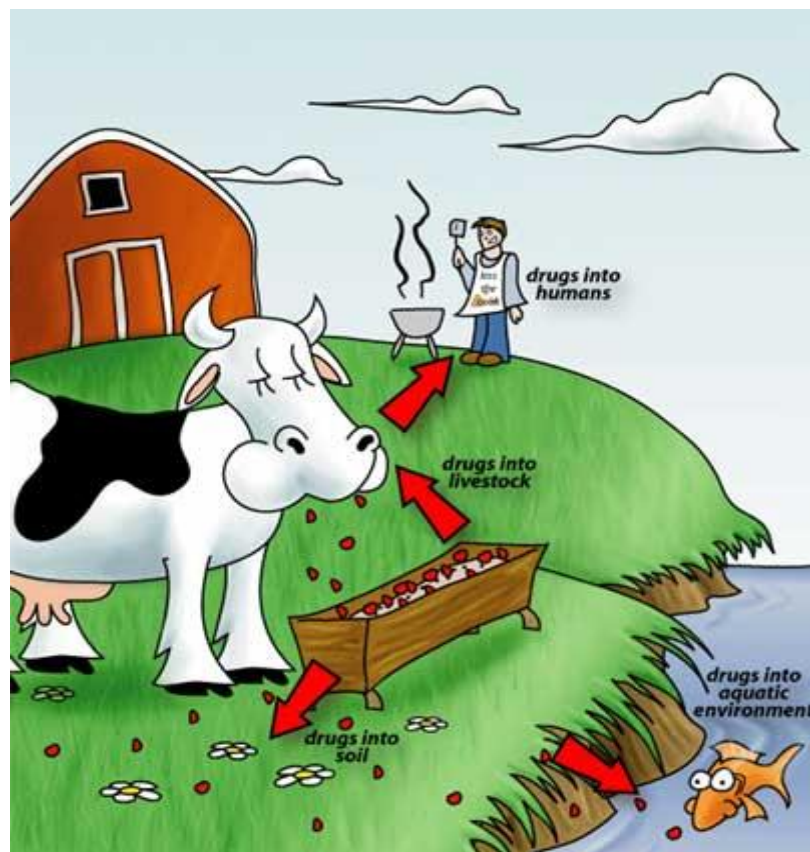


Figura 13.- Uso de los antibióticos en la ganadería (<http://scq.ubc.ca>).

Los estudios sugieren que la exposición a los biocidas lleva a un aumento de la resistencia a los antibióticos. Las acciones antibacterianas de los antibióticos y biocidas muestran muchas similitudes, como son la entrada al interior celular mediante difusión pasiva, los efectos sobre la integridad de la membrana y los efectos sobre diversos puntos del metabolismo bacteriano. Así, la impermeabilidad, la presencia de bombas de eflujo o las alteraciones en la diana pueden ser mecanismos compartidos tanto por biocidas como antibióticos y que determinen una resistencia cruzada (SCENIHR, 2009). Además, los biocidas son incorporados con mayor frecuencia a los productos de higiene diaria, lo que facilita la exposición y aumenta la tolerancia de los microorganismos a los biocidas, y es posible que conlleve a un aumento de la resistencia a antibióticos, efectos ya observados al desarrollarse mutaciones en estudios *in vitro* (SCENIHR, 2009).

La relación entre la tolerancia a los biocidas y la resistencia a los antibióticos estaría determinada por (SCENIHR, 2009):

- la resistencia cruzada: los genes implicados en la resistencia a biocidas y antibióticos pueden compartirse. En los antibióticos, la resistencia cruzada ha sido ampliamente descrita, ya que los distintos antibióticos de una misma clase pueden compartir estructura y mecanismos de acción, por lo que determinados

mecanismos de resistencia pueden conferir resistencia a uno o más miembros de antibióticos de la misma clase.

- cambios en la respuesta de la bacteria tras la exposición a los biocidas, resultando en un aumento de la tolerancia tanto a los biocidas como a los antibióticos.

- co-resistencia: los genes de resistencia a antimicrobianos se suelen encontrar en integrones, transposones o plásmidos, que pueden estar unidos a otros genes de resistencia, por lo que en algunos casos, la transferencia de múltiples genes de resistencia puede ocurrir en un mismo momento.

- selección indirecta de sub-poblaciones tras la exposición a biocidas que resulten en una descenso de la susceptibilidad a biocidas y antibióticos.

- aumento de los mecanismos de reparación del ADN.

#### **4.1.- La vigilancia**

La vigilancia se describe como el hecho de coleccionar datos sobre un problema en cuestión, para posteriormente ser analizados y poder establecerse políticas sobre el adecuado uso de los antimicrobianos (WHO, 2012).

La vigilancia por sí misma no reduce la resistencia a los antimicrobianos, pero la colección de los datos puede usarse para monitorizar la diseminación de cepas resistentes, promover su conocimiento y fundamentalmente, aportarnos información sobre su modo de acción, para así reducir y difundir el adecuado uso de los antimicrobianos (WHO, 2012).

#### **4.2.- Medidas para asegurar el buen uso de los antibióticos**

La resistencia a antimicrobianos es una consecuencia del uso de antimicrobianos, especialmente por el abuso de éstos. Se sabe que existe una clara relación entre el uso y la emergencia de resistencias: el consumo de antibióticos se correlaciona con la frecuencia de resistencias en un país: a mayor abuso de antibióticos, mayor presión selectiva de la bacteria a adquirir genes de resistencia (WHO, 2012).

Así, si los antibióticos fuesen prescritos adecuadamente y sólo cuando son necesarios, y si el tratamiento se siguiese adecuadamente, se limitaría la proliferación de resistencias (WHO, 2012).

Hay muchas opciones disponibles para reducir este uso innecesario, pero el poner en práctica estas medidas es a veces muy problemático, ya que mientras en algunos casos, las acciones deberían basarse en reducir el uso innecesario, en otros

casos, lo imprescindible sería el asegurar el acceso de éstos a quienes los necesitan (WHO, 2012).

Hay dos factores muy importantes que deben de tenerse en cuenta en relación al adecuado uso de los antibióticos (WHO, 2012):

- para que un antibiótico sea efectivo, debe ser de buena calidad, es decir, la bacteria que causa la infección debe ser susceptible a éste. Por lo tanto, se hacen imprescindibles los estudios sobre susceptibilidad microbiana.

- el uso de antibióticos tiene consecuencias tanto individuales como sociales. El uso individual puede llevar a la selección de bacterias resistentes a los antibióticos que pueden infectar a otros miembros de la población, causando infecciones difíciles de tratar (WHO, 2012).

#### **4.3.- Reducir el uso de antibióticos en la ganadería.**

Los antibióticos se han utilizado durante años en el tratamiento de enfermedades, en la prevención de las mismas y en la mejora de la eficiencia alimentaria en la ganadería y aves de corral. Su uso fue implementado en 1950, como una medida para satisfacer la gran demanda de alimentos. Así, cuando se suplementaba con antibióticos el alimento de los cerdos, se ahorraba hasta un 20% de los costes de su alimentación (Allen et al., 2013).

Como hemos comentado, el principal uso de los antibióticos en la cría de animales incluye el tratamiento de las enfermedades y la prevención de las mismas, aunque lo peculiar de esto, es que las dosis usadas en los animales sanos, son mayores que las usadas en los humanos enfermos, lo que ha llevado a encontrar en productos cárnicos bacterias resistentes patógenas de humanos. Es por ello, que algunos países han prohibido el uso de los antibióticos como promotores del crecimiento, aunque la citada práctica requiere que la medida se generalice y que se adopten más medidas que controlen el uso de los antibióticos para este propósito en todos los países (WHO, 2012).

#### *Reducir el uso de antimicrobianos en la ganadería, para reducir la resistencia a antibióticos*

Como en la clínica humana, la introducción de antimicrobianos fue un punto de inflexión en la clínica veterinaria. Estos medicamentos son usados en el tratamiento de infecciones de animales domésticos y de la ganadería, para asegurar el bienestar animal y la producción ganadera. El desarrollo y diseminación de las resistencias a antibióticos es un tema muy importante en la clínica veterinaria. Así, las bacterias



resistentes presentes en los alimentos, pueden diseminarse a los humanos, mediante el consumo de esos productos, un tratamiento térmico inadecuado, la contaminación cruzada con otros alimentos contaminados o incluso, a través del medioambiente (WHO, 2012, Verraes *et al.*, 2013).

#### *Posición actual frente a estas recomendaciones*

La vigilancia y monitorización de las resistencias a los antimicrobianos en los animales es llevada a cabo en muy pocos países, pero los sistemas de monitorización no son comparables debido a diferencias en la metodología (WHO, 2012).

La resistencia a los antimicrobianos en bacterias de origen animal es un problema mundial potenciado por la globalización, que ha facilitado la diseminación de bacterias resistentes de un país a otro a través de los alimentos y el desarrollo de infecciones. La diseminación internacional de patógenos resistentes generan una urgencia de medidas internacionales para minimizar el riesgo de bacterias resistentes y su diseminación desde los alimentos a los hospitales. Asociaciones internacionales como WHO o FAO, han revisado ampliamente el tema y propuesto acciones a seguir por las autoridades nacionales e internacionales (WHO, 2012).

El uso de agentes antimicrobianos en productos alimenticios de origen animal también promueve la transferencia de genes de resistencia. Este fenómeno apunta a la posibilidad de que los genes de resistencia podrían transferirse de animales a humanos vía bacterias no patógenas en productos de origen animal que, posteriormente, podrían ser transferidos a bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal humano. Algo que confirma esta hipótesis es la presencia de los mismos genes de resistencia a vancomicina y cefalosporinas en bacterias humanas y animales (WHO, 2012).

#### *Acciones llevadas a cabo mundialmente*

Actualmente, se tiene muchos datos del riesgo sobre la salud humana derivado del uso de antimicrobianos en la ganadería. Es por ello, que la mayoría de las intervenciones llevadas a cabo por diversos organismos concienciados con este tema, se basan en reducir el uso de determinadas clases de antimicrobianos, especialmente de aquellos utilizados en la clínica humana, en los animales destinados a consumo humano. Así, se están desarrollando nuevas normas que regulen el uso de los antimicrobianos, nuevas medidas que deriven en promover el uso adecuado de los antibióticos y nuevas metodologías para promover la salud animal, con el fin de reducir el tratamiento con antibióticos (WHO, 2012).

*Regulaciones para restringir el uso de antimicrobianos en animales*

El control de las resistencias a antimicrobianos requiere nuevas medidas. En muchos países, los productos farmacéuticos para uso veterinario evalúan el riesgo/beneficio del uso, lo mismo que ocurre con los productos farmacéuticos utilizados en clínica humana aunque, para los antimicrobianos, se incluye además, un estudio del impacto sobre la salud. Así, la evaluación se centraría en evitar los residuos de antimicrobianos en los productos alimenticios y, recientemente, se están incluyendo también estudios sobre el efecto en la aparición de bacterias resistentes a antimicrobianos en animales del matadero. Este proceso incluiría consideraciones sobre si el uso del antimicrobiano tiene efectos sobre la salud humana y su impacto sobre el desarrollo de resistencias a antimicrobianos (WHO, 2012).

Otro aspecto a tener en cuenta sería el modo de administración del antimicrobiano, y especialmente en aquellos utilizados también en la clínica humana, por lo que debería limitarse la administración de éstos mediante inyección (WHO, 2012).

Cada vez más número de países están prohibiendo el uso de los antibióticos como promotores del crecimiento, actuación que está dando muy buenos resultados en los países que han seguido estas recomendaciones. Como ejemplo, tenemos a Dinamarca, que prohibió el uso de los antimicrobianos como promotores del crecimiento en 2000; ésto ha resultado en una considerable reducción de las resistencias en bacterias de origen animal. Los datos muestran como los valores de resistencias nunca volverán a los valores de la época pre-antibióticos, pero sí se observa como los niveles son bajos. El uso debe mantenerse a bajo nivel, ya que el volver al abuso conduciría a un aumento rápido de los valores de resistencia antimicrobiana (WHO, 2012).

Además, la experiencia ha demostrado como cualquier efecto negativo derivado de la prohibición de promotores del crecimiento en animales es mínima a largo plazo, una vez que la industria se adapta a los cambios (WHO, 2012).

*Incrementar la salud animal para reducir el uso de los antibióticos*

La medida más efectiva para reducir el uso de los antimicrobianos es, claramente, reducir la necesidad de su uso. Para ello, la mejora de la salud animal mediante la inmunización frente a infecciones prevalentes es la mejor opción. Sin embargo, aunque se promueva la salud animal, no es seguro que el consumo de los antimicrobianos se reduzca, ya que la mayoría de los antimicrobianos usados como

promotores del crecimiento y como profilácticos, son usados sin tener evidencias de su necesidad ni beneficio (WHO, 2012).

#### *Alternativas al uso de antibióticos en la ganadería*

Son urgentes nuevas alternativas al uso de antibióticos en la industria alimentaria, pero el principal problema reside en la complejidad del tracto gastrointestinal. El conocimiento de los mecanismos mediante los cuales los antibióticos potencian el crecimiento animal, es un tema importante. Algunos de los mecanismos podrían ser: la reducción de la carga bacteriana, eliminación de patógenos, estrechamiento de la capa mucosa y modulación directa del sistema inmune (Allen *et al.*, 2012).

- Aditivos alimentarios: adicionar prebióticos en forma de fibra u oligosacáridos, puede modular la microbiota intestinal en beneficio del hospedador o estimular la producción de metabolitos beneficiosos. Por otro lado, la adición de ácidos orgánicos o prebióticos, produce la disminución y limita la supervivencia de patógenos en el intestino. A su vez, los probióticos serían beneficiosos al ser capaces de colonizar el intestino. Sin embargo, resaltar que las investigaciones sobre el uso de probióticos y prebióticos en este aspecto, no ha aportado resultados concluyentes (WHO, 2012).

- Fagos: esta estrategia implica el uso de virus bacterianos, para actuar frente a una determinada bacteria, por lo que no se producen daños de disbiosis. Los inconvenientes podrían derivar de la neutralización de los fagos por el sistema inmune tras tratamientos repetidos, y el desarrollo de resistencias a los fagos. También podrían darse transferencia de factores de virulencia o genes de resistencia desde el fago a la bacteria hospedadora (WHO, 2012).

- Vacunas: la premisa principal sería la reducción del uso de antibióticos debido a la reducción de infecciones (WHO, 2012).

No hay un informe mágico que aporte la respuesta a la mejor alternativa de los antibióticos, pero destacar a las vacunas y los fagos, que aunque son bastante específicos a cada especie bacteriana, no producen desórdenes en la microbiota intestinal (Allen *et al.*, 2012).

OBJETIVOS

La resistencia a múltiples sustancias antimicrobianas es un problema de salud pública que se viene observando a nivel mundial después de la aparición de los antibióticos. El uso inadecuado y a menudo el sobre-uso de los antimicrobianos ha agravado sin embargo el problema por enriquecimiento de las poblaciones bacterianas resistentes a costa de las sensibles. Con esta frecuencia incrementada de resistencias, nos estamos enfrentando a importantes patógenos humanos que abarcan resistencias a múltiples antimicrobianos, y una disminución de los agentes terapéuticos efectivos disponibles. La diseminación de resistencias a agentes antimicrobianos fuera del ámbito clínico es también un tema preocupante, pues se desconoce en gran parte su impacto real, así como la influencia que tienen otros agentes antimicrobianos, como los biocidas, en el mantenimiento, diseminación y aparición de resistencias a agentes de uso clínico, así como su diseminación en otros ambientes no clínicos como puede ser la cadena alimentaria. Mientras que los biocidas juegan un papel importante en el control de las fuentes potenciales de infección y la diseminación de los microorganismos patógenos fuera del hospedador en diversos ámbitos (clínico, industrial, doméstico), existe una preocupación por el uso incrementado de biocidas junto con la presión selectiva ambiental ejercida por otros agentes (como los empleados en producción agropecuaria o el vertido de residuos industriales tóxicos en aguas y suelos), lo cual ha generado una respuesta de supervivencia en los microorganismos que los capacita para evadir con eficiencia la acción bactericida de muchos agentes (cepas multiresistentes). En la actualidad se intenta dilucidar si existen mecanismos compartidos de resistencia entre antibióticos, y biocidas que permitan a las bacterias activar genes de respuesta global a las agresiones externas.

Los alimentos son considerados uno de los reservorios más importantes de resistencias a antimicrobianos, sin embargo no se conoce qué tipo de alimentos puede representar un mayor riesgo para la aparición de resistencias cruzadas a biocidas y antibióticos de uso clínico. En este sentido, hemos planteado investigar la resistencia a antibióticos y biocidas en bacterias multiresistentes, especialmente pseudomonads, presentes en la carne cruda y también en los ambientes del matadero a lo largo de la cadena de producción la carne. Esto se debe a que la carne está considerada uno de los productos más susceptibles a la contaminación microbiana debido a su composición físico-química y su actividad de agua y también al estar sujeta durante su procesamiento

(sacrificio, evisceración, corte...) en el matadero a las condiciones idóneas para que las bacterias adquieran y desarrollan dicha resistencia. Además, hemos analizado también la resistencia a antibióticos en otras bacterias multiresistentes como los enterococos presentes en los alimentos fermentados de origen animal y vegetal al ser considerados los alimentos de mayor consumo a nivel mundial. La doble faceta presentada por los enterococos tanto como patógenos nosocomiales como cultivos iniciadores y probióticos así como su multiresistencia a diferentes antimicrobianos nos animó a evaluar dichos mecanismos de resistencia en cepas aisladas de diferentes productos tradicionales fermentados y encontrar alguna estrategia para contrarrestar dicha resistencia o evitar su diseminación en la cadena alimentaria.

Teniendo en cuenta los argumentos antes mencionados, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Determinar la prevalencia de bacterias resistentes a biocidas y a antibióticos en la carne a lo largo de su cadena de producción.
- 2) Determinar la diversidad, distribución y cantidad de genes de resistencia a antibióticos relevantes en la carne a lo largo de su cadena de producción.
- 3) Estudiar los determinantes genéticos de resistencia a antibióticos y biocidas en pseudomonads aislados de la carne a lo largo de su cadena de producción.
- 4) Evaluar los mecanismos de resistencia a antibióticos en enterococos aislados de alimentos tradicionales fermentados.
- 5) Conocer el papel de las bombas de exporte en la resistencia de enterococos a antibióticos y biocidas así como las estrategias para contrarrestar dicha resistencia.

## TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

## Capítulo I

**Incidencia de resistencias a antibióticos y/o biocidas en bacterias aisladas de la cadena de producción de la carne.**



## **APORTACIÓN 1**

**Leyre Lavilla Lerma, Nabil Benomar, Antonio Gálvez, Hikmate Abriouel. 2013. Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. International Journal of Food Microbiology 161: 97–106.**



# Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production

Leyre Lavilla Lerma, Nabil Benomar, Antonio Gálvez, Hikmate Abriouel \*

Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, 23071-Jaén, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 3 August 2012

Received in revised form 24 October 2012

Accepted 21 November 2012

Available online 8 December 2012

### Keywords:

Biocide resistance  
Antibiotic resistance  
Lamb slaughterhouse  
Psychrotrophs  
*Pseudomonas*  
Lactic acid bacteria

## ABSTRACT

In order to investigate the prevalence of resistant bacteria to biocides and/or antibiotics throughout meat chain production from sacrifice till end of production line, samples from various surfaces of a goat and lamb slaughterhouse representative of the region were analyzed by the culture dependent approach. Resistant Psychrotrophs ( $n = 255$  strains), *Pseudomonas* sp. ( $n = 166$  strains), *E. coli* ( $n = 23$  strains), *Staphylococcus* sp. ( $n = 17$  strains) and LAB ( $n = 82$  represented mainly by *Lactobacillus* sp.) were isolated. Resistant psychrotrophs and pseudomonads (47 and 29%, respectively) to different antimicrobials were frequently detected in almost all areas of meat processing plant regardless the antimicrobial used, although there was a clear shift in the spectrum of other bacterial groups and for this aim such resistance was determined according to several parameters: antimicrobial tested, sampling zone and the bacterial group. Correlation of different parameters was done using a statistical tool "Principal component analysis" (PCA) which determined that quaternary ammonium compounds and hexadecylpyridinium were the most relevant biocides for resistance in *Pseudomonas* sp., while ciprofloxacin and hexachlorophene were more relevant for psychrotrophs, LAB, and in lesser extent *Staphylococcus* sp. and *Escherichia coli*. On the other hand, PCA of sampling zones determined that sacrifice room (SR) and cutting room (CR) considered as main source of antibiotic and/or biocide resistant bacteria showed an opposite behaviour concerning relevance of antimicrobials to determine resistance being hexadecylpyridinium, cetrimide and chlorhexidine the most relevant in CR, while hexachlorophene, oxonia 6P and PHMG the most relevant in SR. In conclusion, rotational use of the relevant biocides as disinfectants in CR and SR is recommended in an environment which is frequently disinfected.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

In recent years, the extensive and inappropriate use of antimicrobial agents in human, veterinary, domestic and as disinfectants in food industry (Dixon, 2000; Feinman, 1999; Magee et al., 1999; Munsch-Alatossava and Alatossava, 2007) may generate a selective pressure for emergence of multiple drug resistant (MDR) bacteria (Levy, 1998; Russell, 2000, 2002; Russell et al., 1998). Infections due to MDR bacteria are still growing and the risk factors include among others the exposure to antimicrobial drugs (Safdar and Maki, 2002). Furthermore, the evolutionary antimicrobial resistance strategies of bacteria especially foodborne pathogens which include cell impermeability, target site mutation, drug efflux and drug inactivation have resulted in a great challenge due to the emergence of highly resistant bacteria to different antimicrobials. Nowadays, antibiotic resistance has become a significant and increasing public health problem all over the world especially in developed countries. In fact, previously effective antibiotics are losing their power in all purposes they were

used for (people, animals and plants) which lead to treatment failures and increased morbidity, mortality, length of hospitalisation and cost of healthcare (Cosgrove, 2006). In addition, the use of antibiotics known as "societal drugs" (Levy, 1997) may lead to prevalence of resistance as a global threat because of the dissemination of resistant bacteria and resistance genes to spread from different sources to humans and also to the environment which may have a tremendous impact. Taking into account that microbial ecosystems are interconnected, resistant bacteria may flow from animal to food chain and thereafter in community reservoir. The spread of resistance genes to humans via food is highly documented by several authors in different foodstuffs (Teuber, 1999; Threlfall et al., 2000; White et al., 2002) and also by the European Food Safety Authority (EFSA, 2008). In this way, food of animal origin represent an important reservoir of antibiotic resistance due to several causes like the historic use of antibiotics as growth promotion in food animals nowadays banned in Europe (SCAN, 1996, 1998), or as therapeutic and preventive treatments.

Bacterial resistance due to biocides (antiseptics, disinfectants and preservatives) used for centuries in various forms (Hugo, 1977, 1978, 1981, 1991) was first described in the 1950s and 1960s increasing after that because of the increasing use of biocides in food industry and sanitary. Selection and development of bacteria resistant to biocides

\* Corresponding author at: Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Edif. B3. Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas s/n. 23071-Jaén, Spain. Tel.: +34 953 212003; fax: +34 953 212943.

E-mail address: [hikmate@ujaen.es](mailto:hikmate@ujaen.es) (H. Abriouel).

and antibiotics is of great concern considering the commonality target of both antimicrobials which lead to the emergence of cross-resistance (Chuanchuen et al., 2001; Gilbert et al., 2002; Gutmann et al., 1985), the maintenance of resistant strains by low and sub-effective concentrations of antimicrobial agents (Russell and McDonnell, 2000) and also through development of polygamous resistance mechanisms such as efflux pumps (Chuanchuen et al., 2001; Levy, 2002; Ma et al., 1994). Furthermore, several biocides were shown to be implicated in the selection and persistence of bacterial resistance with low-level antibiotic resistance such as cationic agents (QACs, chlorhexidine, diamidines, acridines) and triclosan (Behr et al., 1994; Mayer et al., 2001; Reverdy, 1995). Among resistant bacteria of food origin, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Campylobacter*, *Yersinia*, non-typhoid *Salmonella* and other pathogens (Meyer et al., 2008; Miles et al., 2006; Padungtod et al., 2006; Threlfall et al., 2003) may act as a donor of antimicrobial resistance genes for other pathogenic and commensal bacteria.

To our knowledge, this is the first study carried out in a lamb slaughterhouse and only few studies were done with specific pathogenic bacteria like *Campylobacter* (Peyrat et al., 2008) and *Clostridium chauvoei* (Sathish and Swaminathan, 2008) in poultry and bovine slaughterhouses, respectively, and staphylococci in meat and poultry processing plants (Sundheim et al., 1992). Considering meat products the most susceptible foodstuffs for microbial contamination due to its chemical compositions, higher water activity and also its origin, a slaughterhouse constitute an ideal environment where resistance may develop and exist because of the different processes carried out such as sacrifice, cutting and evisceration that contaminate both carcasses and surfaces (floor and equipments) with gut bacteria (Borck and Pedersen, 2005; Peyrat et al., 2008). Since specific genotypes (resistant) may have the ability to survive routine disinfection procedures, the purpose of the present study was to analyze the prevalence of resistance to antibiotics and/or biocides in bacteria throughout meat chain production, from sacrifice to the end product by using the culture dependent approach.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample collection and processing

The present research was performed with samples collected from a local goat and lamb slaughterhouse (Jaén, Spain). This slaughterhouse is representative of the region and receives animals from different suppliers and geographic locations. Different samples were collected with sterile swabs from the following zones (Fig. 1): entrance (E), sacrifice-room (SR), fridge (F), cutting-room (CR), freezing-tunnel

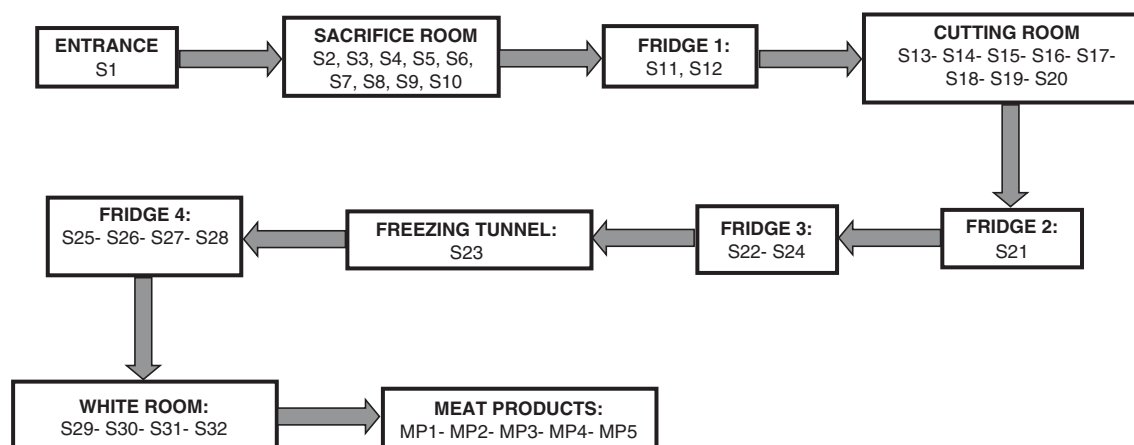
(FrT) and white-room (WR). The samples were transported to the laboratory in refrigerated conditions. In addition, we examined five meat products (MP) from different supermarkets in Jaén (Spain).

### 2.2. Antimicrobials

The antimicrobial agents used in this study include various antibiotics used in clinical area and biocides commonly used in food industry. Antibiotics were assayed at the following concentrations according to guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009) in TSB broth (Scharlab, Barcelona, Spain): Amoxicillin (GlaxoSmithKline S.A., Spain) at 25 µg/ml, Cefuroxime (Normon Lab, S.A., Spain) at 30 µg/ml, Ciprofloxacin (Fresenius Kabi, Spain) at 5 µg/ml, and Erythromycin (Amdipharm Limited, Ireland) at 15 µg/ml. Biocides such as Hexachlorophene (Aldrich Chemical Co- England), Hexadecylpyridinium chloride monohydrate (Sigma Aldrich, USA); Triclosan (Fluka, Italy), Cetrimide (Sigma Aldrich, USA), Oxonia 6P, PHMG; Benzalkonium chloride (Sigma Aldrich), and Chlorhexidine dihydrochloride (Sigma Aldrich, US) were assayed at a final concentration of 0.025 µg/ml.

### 2.3. Isolation of bacteria resistant to biocides and/or antibiotics

Various groups of bacteria were isolated throughout meat production chain such as psychrotrophs, pseudomonads, *Staphylococcus* sp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and lactic acid bacteria. For this, selected slaughterhouse surfaces (floor, tables, walls, sinks and drains) in different zones (described above) were analysed. Sterile swabs were used to collect samples from sites of 100 cm<sup>2</sup> in the selected surfaces, then they were immersed in 10 ml of sterile BHI (Brain Heart Infusion, Scharlab, Barcelona, Spain) broth and incubated at 22 °C for 24 h. After revivification, 50 µl of each sample was added to 5 ml of selective media: King broth (Scharlab, Barcelona, Spain) for pseudomonads (King et al., 1954), Brilliant Green Bile Lactose broth (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) for *E. coli* (Szita and Biró, 1986), Fraser broth (Scharlab, Barcelona, Spain) for *L. monocytogenes* (Fraser and Sperber, 1988), Giolitti Cantoni broth (Scharlab, Barcelona, Spain) for staphylococci (Giolitti and Cantoni, 1966), MRS-sodium azide broth (Scharlab, Barcelona, Spain) for lactic acid bacteria (Ahn et al., 2002) and TSB (Scharlab, Barcelona, Spain) for psychrotrophs (Atlas and Parks, 1993). The different inoculated media were incubated at 22 °C (King), 30 °C (MRS) or 37 °C (Fraser, Giolitti Cantoni and Brilliant Green Bile Lactose) for 24–48 h, and at 7 °C (TSB) for 10 days (Ercolini et al., 2009). Isolation of bacteria resistant to various antimicrobials (antibiotics or biocides) at the concentrations described in Section 2.2 was carried out by adding 10 µl of each cultured sample to



**Fig. 1.** Flowchart of meat chain production in a lamb and goat slaughterhouse of Jaén. Samples S1, S4, S5, S30: sinks; S8, S9, S10, S12, S13, S21, S24 and S29: drains; S11, S22, S23 and S26: walls; S14, S15, S16, S17 and S32: tables; S2, S3, S6, S7, S18, S19, S20, S27, S31 and S33: equipment; S28: floor.

1 ml TSB containing different antibiotics or biocides. The samples were incubated under the same conditions described above for each bacterial group. The presence of turbidity indicated bacterial growth, and therefore, resistance to the antimicrobial agent and concentration used. Bacteria from cultures grown in the presence of antimicrobials were transferred (10 µl) to 1 ml TSB tubes containing the same antimicrobial at double of the initial concentration and incubated for further 24 h before they were isolated by streaking on TSA (Tryptone Soja Agar, Scharlab, Barcelona, Spain), subjected to Gram stain and then stored in BHI broth containing 20% glycerol at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.4. Identification of bacterial isolates

Presumptive identification of isolates was carried out with the observation of colony characteristics and cell morphology, Gram staining and catalase. Molecular identification at genus and species level was done by PCR analysis. Crude DNA Lysate Preparation was done as described by Jensen et al. (1998). This DNA preparation was used as template in further PCR reactions. For genus-specific PCR of presumptive *Pseudomonas*, *Staphylococcus* and *Lactobacillus* isolates, PCR was done using the methods described by Yadav et al. (2003), Morot-Bizot et al. (2004), and Singh and Ramesh (2008), respectively. Species-specific PCR was done following the methods described by Chen and Knabel (2007) for *L. monocytogenes*, Marcos et al. (1999) for *S. aureus*, Seidavi et al. (2010) for *Escherichia coli*, Dutka-Malen et al. (1995) for *Enterococcus faecalis* and *E. faecium*. The other LAB were identified by sequencing of 16S rDNA gene as described by Abriouel et al. (2005). The products of amplification were purified using a Quantum Prep PCR Kleen Spin column (BioRad, Madrid, Spain), and sequenced using the primers Sp3, Sp4 and Sp5 according to Weisburg et al. (1991) in the CEQ 2000 XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

#### 2.5. Analysis of bacteria resistant to biocides and/or antibiotics throughout meat chain production

The presence of resistant bacteria to biocides and/or antibiotics throughout meat chain production was analysed according to several parameters: antimicrobial used, sampling zone and the bacterial group. For this purpose, the number of resistant isolates was determined under different conditions with the aim to evaluate the impact of biocides and antibiotics on the bacterial response to various stresses throughout meat chain production.

#### 2.6. Statistical analysis

Statistical analysis of data was accomplished using Excel 2007 and XLSTAT 2012 trial version (2012.4.02 Addinsoft, France) and the correlation between all slaughterhouse parameters and resistance was determined by principal component analysis (PCA).

### 3. Results

#### 3.1. Isolation and identification of resistant bacteria to biocides or antibiotics

A total of 1237 bacterial isolates resistant to one of the antimicrobials used (biocides or antibiotics) were recovered from surfaces of a slaughterhouse in Jaén along the meat processing plant (Fig. 1, Table 1). After Gram-staining of isolates from the different selective media, a total of 790 isolates were selected, comprising 320 psychrotrophs (40.51%), 180 presumptive *Pseudomonas* sp. (mesophiles) (22.78%), 131 presumptive *E. coli* (16.58%), 82 lactic acid bacteria (10.38%), 42 presumptive *Staphylococcus* sp. (5.32%) and 35 presumptive *L. monocytogenes* (4.43%) (Table 1). The largest number of resistant isolates corresponded to psychrotrophs (40.51%, Table 1), which were distributed along the different zones of the meat processing plant and being highly detected in the sacrifice and cutting rooms (SR and CR) as shown in Fig. 2. The

**Table 1**

Biocide or antibiotic-resistant bacteria isolated from the slaughterhouse surfaces and the end products.

Bacteria	Number (and relative percentage) of isolates resistant to biocides or antibiotics		
	Selective media	Gram stain	PCR
Psychrotrophs	321 (25.95%)	320 (40.51%)	255 (46.96%)*
<i>Pseudomonas</i> sp.	334 (27%)	180 (22.78%)	166 (30.57%)**
<i>E. coli</i>	213 (17.22%)	131 (16.58%)	23 (4.24%)
Lactic acid bacteria	141 (11.40%)	82 (10.38%)	82 (15.10%)*
<i>Staphylococcus</i> sp.	87 (7.03%)	42 (5.32%)	17 (3.13%)
<i>L. monocytogenes</i>	141 (11.40%)	35 (4.43%)	0
Total	1237	790	543

\*Non-pseudomonads psychrotrophs.

\*\*From 166 *Pseudomonas* sp., 65 strains were psychrotrophic and 101 strains were mesophilic.

other presumptive bacterial groups were also dominant in SR and CR, but also in the final steps of meat processing like fridge 4 (F4), white room (WR) and the end products (MP). However, freezing tunnel showed the lowest percentage of resistant bacteria in comparison with other zones (Fig. 2).

Molecular identification by PCR targeting genus *Pseudomonas* revealed that 20% of psychrotrophs belonged to *Pseudomonas* sp. (65 of 320 isolates, Table 1). Non-pseudomonads psychrotrophs were the most frequently isolated bacteria throughout meat chain production reaching 255 isolates (46.96% of the total, Table 1 and Fig. 3) followed by *Pseudomonas* sp. (30.57%, Table 1 and Fig. 3) which was presented by both mesophilic (101 isolates, 18.60%) and psychrotrophic (65 isolates, 11.97%) strains. Other bacterial groups in decreasing order of importance were LAB (15.10%, Table 1 and Fig. 3), *E. coli* (4.24%, Table 1 and Fig. 3) and *Staphylococcus* sp. (3.13%, Table 1 and Fig. 3) as revealed by species and genus-specific PCR for both *E. coli* and *Staphylococcus* sp., respectively. Species-specific PCR of *S. aureus* and *L. monocytogenes* did not give any positive result in any case of the presumptive bacteria. Concerning lactic acid bacteria, molecular methods identified 16 cocci as *Enterococcus* sp. (10 strains), *E. faecium* (2 strains), *E. faecalis* (1 strain), *Vagococcus* sp. (1 strain), *Aerococcus* sp. (1 strain) and *Lactococcus garviae* (1 strain). All bacilli investigated were identified as *Lactobacillus* sp.

#### 3.2. Determination of the prevalence of resistant bacteria to biocides and/or antibiotics according to different parameters

Isolates identified by PCR (543) showing resistance to biocides (275 isolates) or antibiotics (268 isolates) were studied (Table 2). Concerning resistance to biocides, chlorhexidine was the most important biocide thus the frequency of CH-resistant bacteria isolated especially from CR and SR was higher (20.36%, 56 isolates vs 275 isolates), while hexachlorophene showed the lowest percentage of resistance with only 2.91% of isolates (Table 2). Regarding the other biocides tested, from all isolates 17–18% showed resistance to triclosan and benzalkonium chloride, 9–11.6% to oxonia 6P, cetrimide, PHMG and hexadecylpyridinium (Table 2). It is noteworthy, that in all cases the highest percentage of biocide-resistant isolates was obtained from SR and CR, except for hexachlorophene which most resistant bacteria were isolated from entrance (Table 2).

Concerning antibiotic resistant bacteria, 24–34% of all isolates showed resistance to cefuroxime, amoxicillin and erythromycin (Table 2). However, most of isolates showed high sensitivity to ciprofloxacin. In a similar way, high percentage of antibiotic-resistant bacteria was obtained from SR and CR.

##### 3.2.1. Antimicrobial agent

Concerning biocides, psychrotrophs were the most resistant microorganisms isolated throughout meat chain production followed by *Pseudomonas* sp. as detected by PCR (mesophilic and psychrotrophic



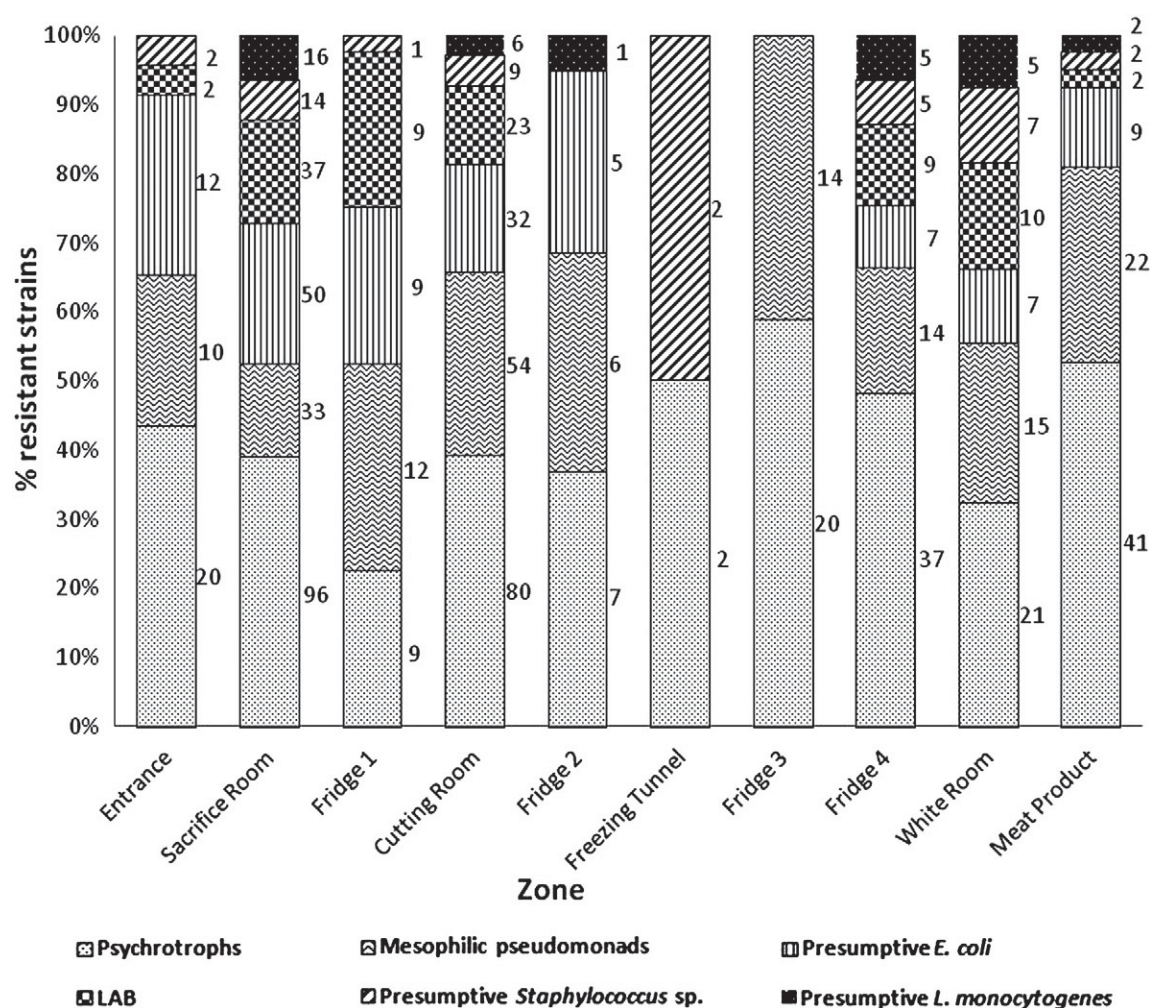


Fig. 2. Presumptive identification of bacteria resistant to biocides and/or antibiotics in different slaughterhouse zones throughout meat chain production. The numbers shown indicate the number of resistant isolates obtained in each case.

isolates) regardless the biocide used except for cetrimide which favoured the selection of pseudomonads and thereafter of psychrotrophs (Fig. 4A). However, the resistance of other microbial groups was highly dependent on the biocide used. In the case of chlorhexidine, triclosan, and in a lesser extent benzalkonium and PHMG, the selection of resistant

LAB was induced after psychrotrophs and pseudomonads (Fig. 4A). However resistant *Staphylococcus sp.* and *E. coli* were less frequent being completely inhibited in the presence of hexadecylpyridinium and hexachlorophene. Other biocides (benzalkonium, PHMG, cetrimide, and

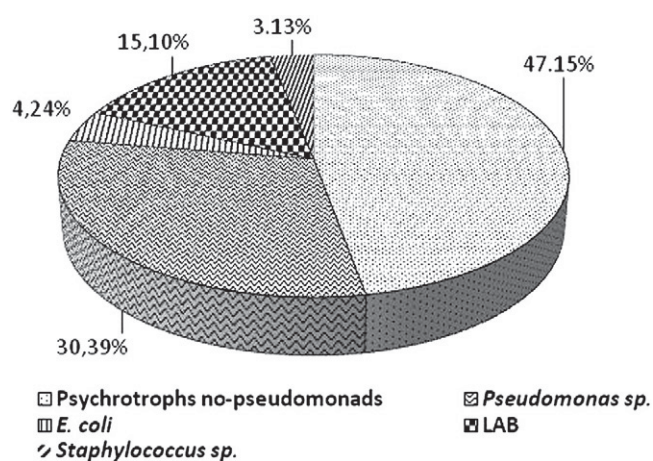


Fig. 3. Antimicrobial resistance (biocides and antibiotics) among bacterial groups after PCR identification.

Table 2  
Distribution of isolates resistant to biocides or antibiotics according to slaughterhouse area.

Antimicrobial	Zone										Total (%)
	E	SR	F1	CR	F2	F3	FrT	F4	WR	MP	
	Number of strains										
Chlorhexidine	3	13	0	22	1	3	0	5	5	4	56 (10.3)
Benzalkonium	2	16	3	9	1	7	0	3	2	7	50 (9.2)
Hexadecylpyridinium	1	4	1	7	2	1	0	4	1	4	25 (4.6)
Cetrimide	2	4	1	9	0	0	0	4	2	5	27 (5.0)
PHMG	2	11	2	4	0	0	0	4	4	3	30 (5.5)
Hexachlorophene	3	3	0	1	0	0	0	0	0	1	8 (1.5)
Triclosan	3	11	1	11	2	0	0	5	6	8	47 (8.7)
Oxonia 6P	2	12	0	4	0	3	0	5	4	2	32 (5.9)
Amoxicillin	2	23	7	29	2	7	1	8	5	6	90 (16.6)
Cefuroxime	4	27	5	25	2	7	1	6	7	8	92 (16.9)
Ciprofloxacin	0	8	1	5	0	2	0	1	3	1	21 (3.9)
Erythromycin	5	19	1	16	1	4	0	4	6	9	65 (12.0)
<b>Total</b>	29	151	22	142	11	34	2	49	45	58	543

E: entrance, SR: sacrifice room, F1: fridge 1, CR: cutting room, F2: fridge 2, F3: fridge 3, FrT: freezing tunnel, F4: fridge 4, WR: white room and MP: meat products.

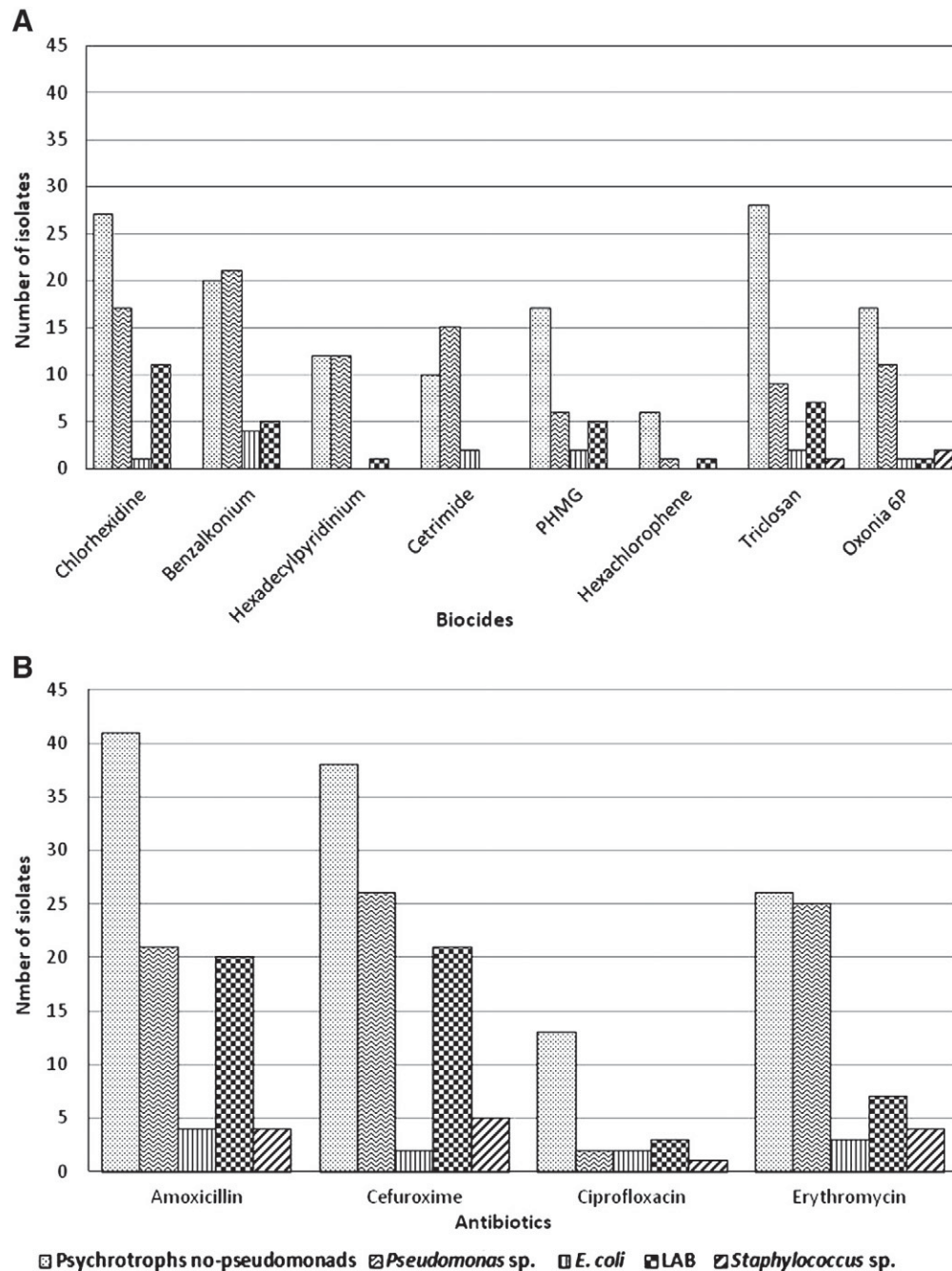


Fig. 4. Number of isolates showing biocide (A) or antibiotic resistance (B) according to antimicrobial tested and bacterial group.

chlorhexidine) allowed only the selection of resistant *E. coli* but not *Staphylococcus* sp. Concerning *L. monocytogenes*, it was not possible to select any resistant isolate (Fig. 4A).

When resistance to antibiotics was studied, psychrotrophs and *Pseudomonas* sp. followed the same pattern as with biocides being psychrotrophs the most resistant group to all antibiotics tested (amoxicillin, cefuroxime, ciprofloxacin and erythromycin) (Fig. 4B). This resistance was more appreciated in the case of amoxicillin and cefuroxime reaching higher number of resistant isolates, followed by erythromycin. However, ciprofloxacin was twice time more effective than the other antibiotics against psychrotrophs (Fig. 4B). In the case of *Pseudomonas* sp., erythromycin, cefuroxime and amoxicillin showed the same behavior towards selection of resistant pseudomonads reaching approximately the same percentage of isolates (Fig. 4B). However ciprofloxacin was very effective against *Pseudomonas* sp., *E. coli*, *Staphylococcus* sp.

and LAB. On the other hand, the most relevant data was the prevalence of resistant LAB to cefuroxime, amoxicillin and erythromycin than other bacterial groups (*E. coli* and *Staphylococcus* sp.).

### 3.2.2. Sampling zone

Analysis of resistance to biocides and antibiotics was also carried out depending on the processing area throughout meat chain production along the processing plant. The results obtained after bacteria identification by PCR indicated a high percentage of resistance to biocides and also to antibiotics in SR followed by CR (Table 3). However, freezing tunnel (FrT) and fridge 2 (F2) showed the lowest percentage of resistant bacteria in comparison with other zones being able only to isolate psychrotrophs and/or pseudomonads (Table 3). Psychrotrophs were highly isolated from SR and CR; however, *Pseudomonas* sp. were frequently detected in CR, F3 and MP. Concerning the other processing

**Table 3**

Numbers of resistant psychrotrophs, *Pseudomonas* sp., *E. coli*, LAB and *Staphylococcus* sp. according to the sampling zone.

Microbial group	Zone										
	E	SR	F1	CR	F2	F3	FrT	F4	WR	MP	Total
	Number of strains										
Non-pseudomonads psychrotrophs	14	86	5	70	4	5	2	23	14	32	255
<i>Pseudomonas</i> sp.	10	15	7	42	6	29	0	17	16	24	166
LAB	2	30	7	21	1	0	0	9	10	2	82
<i>E. coli</i>	1	13	2	7	0	0	0	0	0	0	23
<i>Staphylococcus</i> sp.	2	7	1	2	0	0	0	0	5	0	17
<b>Total</b>	29	151	22	142	11	34	2	49	45	58	543

zones, entrance showed less resistant bacteria than the last steps of meat processing and meat products due probably to spreading of resistant bacteria from carcasses. After cutting, pathogenic bacteria such as *E. coli* and *Staphylococcus* sp. were absent in all subsequent areas processing being not detectable in the end products which suggest their high sensitivity to the antimicrobials used (Table 3).

### 3.2.3. Bacterial group

Considering bacterial group, the highest percentages of bacteria resistant to biocides as well as to antibiotics corresponded to psychrotrophs and pseudomonads, although LAB was also important especially in the case of antibiotics (Fig. 5). Concerning other bacterial groups, low percentages of resistance were detected in *E. coli* and *Staphylococcus* sp. regardless the type of antimicrobial (biocide or antibiotic) (Fig. 5).

### 3.2.4. Principal component analysis

Taking into account the complexity and volume of data, principle component analysis (PCA) was used as mathematical tool to evaluate the relationship between all antimicrobials tested in this study in function of two variables: sampling zone and microbial group. Fig. 6 shows the biplot graph of the relationship between the antimicrobials tested (biocides and antibiotics, scores) and sample variables (bacterial groups and

sampling zones, loadings). As shown in Fig. 6A, cetrimide, benzalkonium and hexadecylpyridinium were the most relevant biocides that determined resistance in *Pseudomonas* sp., while ciprofloxacin and hexachlorophene were less relevant. On the contrary, psychrotrophs showed the inverse situation being ciprofloxacin and hexachlorophene the most determinant antimicrobials of resistance in this bacterial group. Concerning LAB, their resistance was more similar to psychrotrophs than to pseudomonads. However, in the case of *E. coli* and *Staphylococcus* sp., they occupied an intermediate position between psychrotrophs and pseudomonads. Analysis of the relationship between antimicrobials and sampling zone (Fig. 6B) showed that the relevant antimicrobials to determine resistance in CR were hexadecylpyridinium, cetrimide and chlorhexidine, while in SR were hexachlorophene, oxonia 6P and PHMG. Concerning other sampling zones, the resistance was determined by a wide range of antimicrobials and the differences were less noticeable than in CR and SR.

## 4. Discussion

Chemical antimicrobials are widely applied in the food processing industry and the survival of bacteria after cleaning and disinfection represents a potential food safety hazard; thus, bacteria may develop resistance to several detergents and disinfectants used habitually in the standardized procedures of cleaning and disinfection. In this way, several factors may decrease the effect of disinfectant like the presence of organic matter which act as a protector for bacteria (Peyrat et al., 2008), the presence of biofilms and adaptation of bacteria through regular exposure to sublethal concentrations of disinfectants. Furthermore, foods may provide an excellent environment for microbial growth both in food matrices and also on contaminated equipment surfaces used for food handling and processing. In fact, equipment surfaces are recognized as sources of microbial contamination and recontamination in food industry, and thus increasing the opportunities for resistant bacteria to persist in food processing environments as planktonic cells or as biofilms (Romanova et al., 2007). In the present study, we evaluated antibiotic and/or biocide-resistance prevalence of several microbial groups (psychrotrophs, pseudomonads, *E. coli*, staphylococci and LAB)

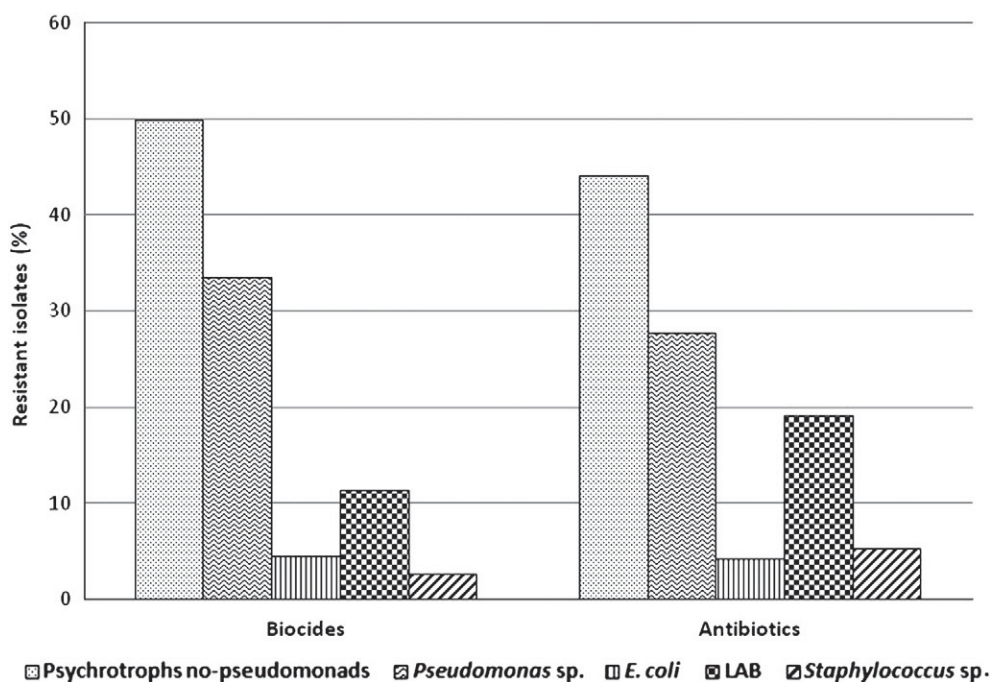
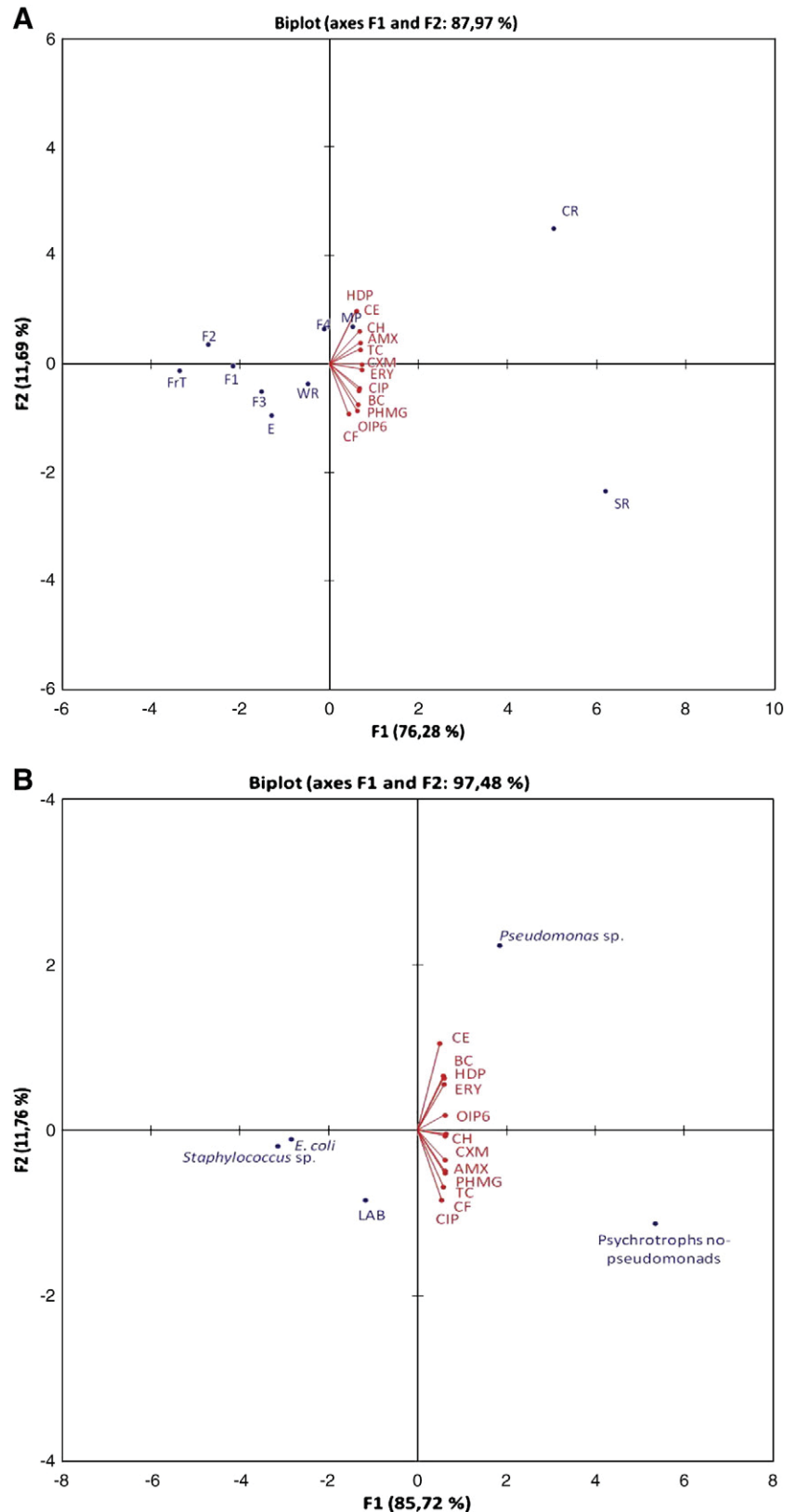


Fig. 5. Resistance to biocides and antibiotics according to the microbial group.



**Fig. 6.**

Biplot of the simultaneous evaluation of the relationship of scores (antimicrobials) and sample variables (A: bacterial group, B: sampling zone). Antimicrobials: AMX, amoxicillin; BC, benzalkonium; CE, cetrinide; CF, hexachlorophene; CH, chlorhexidine; CIP, ciprofloxacin; CXM, cefuroxime; ERY, erythromycin; HDP, hexadecylpyridinium; OIP6, oxonia 6P; PHMG and TC, triclosan.

on meat processing plant surfaces throughout meat chain production from sacrifice until end products. From the data obtained in this study, the questions arose at what stage these resistant bacteria actually enter

the production process, which microbial group may be the predominant and which antimicrobial may exert a strong selection pressure on resistant bacteria. Any knowledge about that is of great concern thus it will



provide valuable information to reduce the sources of contamination with resistant bacteria during meat processing and thus to be spread to human via food chain.

Determination of the prevalence of biocide and/or antibiotic-resistant bacteria isolated from the slaughterhouse surfaces was done applying different methods and considering several parameters. At first instance Gram stain was used as first test in a complete identification of different bacterial groups recovered from selective media. The accuracy of Gram stain was variable depending on the bacterial group, for example, for *E. coli*, LAB, *Staphylococcus* sp. and *Pseudomonas* sp., the accuracy of the test was of 48–62% with respect to the selective media. However, this accuracy was higher with respect to molecular methods reaching 100% for LAB, 92.22% for *Pseudomonas* sp., 40% for *Staphylococcus* sp. and only 17.56% for *E. coli*. Moreover, the accuracy of Gram stain was of 0% in the case of *L. monocytogenes* as confirmed by PCR (Table 1). The accuracy of Gram stain is highly dependent on the bacterial group and thus on the selective media used which determine the growth of specific microorganisms, so we could not make a general conclusion about this test that depends also on physico-chemical growth conditions.

Analysis of the resistant bacteria in slaughterhouse environment throughout meat processing showed frequent occurrence of psychrotrophs and pseudomonads (47 and 30%, respectively) in almost all areas of meat processing plant regardless the antimicrobial tested (biocides or antibiotics). This data is of great relevance since psychrotrophs (mainly Gram-negative bacteria, data not shown) and pseudomonads could induce organoleptic changes in the product (appearance, color, consistency, smell and taste) even if there are kept at temperatures considered optimal for preservation (low temperature). In general, the main psychrotrophs present in meat are composed of *Pseudomonas* (especially *P. fragi*), *Acinetobacter* and *Moraxella* (Kraft, 1992). On the other hand, analyzing the different zones of meat processing plant, entrance (E) showed low percentage of resistant bacteria; however, in the sacrifice room (SR) we detected the highest number of isolates including pathogenic bacteria which suggest that the animal may be a major source of antibiotic and/or biocide resistant bacteria. Such resistant bacteria could be spread after animal sacrifice to the environment and thus to other meat products which act as reservoirs. Furthermore, the origin of resistant bacteria may be also evident in the cutting room (CR), thus a high percentage of resistant bacteria was recovered because of the spreading of bacteria from animal tissues and visors. Although these data indicate that the raw meat may be a major source of antibiotic and/or biocide resistant bacteria, other sources could not be excluded such as human handling and the production environment. Besides the reasons exposed above, the high resistance to antimicrobials of bacteria isolated from sacrifice and cutting rooms may be also due to the extensive use in those areas of some antimicrobials as disinfectant agents that may exert a selective pressure to develop resistance to a wide range of antimicrobials which share similar resistance mechanisms (i.e. efflux pumps) or by the horizontal gene transfer as demonstrated recently by Ciusa et al. (2012) in the case of triclosan in clinical isolates. In this way, freezing tunnel was the area with less resistant bacteria (two isolates) due to the hostile conditions for survival by exposure to low-temperature stress. However, it is also known that certain environmental conditions and stress response mechanisms might even contribute to increasing resistance development and expression by changing the composition of the cell surface of bacteria or inducing the formation of an efflux system (McCallum et al., 2010) which was the case of lower temperatures reached in fridges (for ex. F4 with 49 resistant isolates, 9%). Regarding handling processes, the white room exhibited 8.29% of resistant isolates including psychrotrophs, *Pseudomonas* sp., LAB and *Staphylococcus* sp. being the presence of this latter the result of meat contamination by human handling during meat packaging.

In the current study, 166 resistant *Pseudomonas* sp. strains (both mesophilic and psychrotrophic strains) were isolated throughout meat chain production being highly resistant to chlorhexidine and

quaternary ammonium compounds (benzalkonium and cetrimide). In a similar way, non-pseudomonads psychrotrophs represented especially by Gram-negative bacteria (75%, data not shown) showed resistance to chlorhexidine, but also to triclosan. In general, Gram-negative bacteria showed more resistance to biocides such as quaternary ammonium compounds than Gram-positive bacteria, in fact benzalkonium chloride was shown to be more effective on Gram-positive than Gram-negative bacteria, except *Bacillus cereus* because of its ability to form spores (Fazlara and Ekhtelat, 2012). Concerning Gram-negative bacteria, various reports showed that bacteria have different resistance (*Pseudomonas aeruginosa* > *Escherichia coli* > *Staphylococcus aureus*) against benzalkonium chloride in suspensions (Heinzel, 1998) which is in concordance with the results obtained in the current study with quaternary ammonium compounds being pseudomonads highly resistant than *E. coli* and this latter than *Staphylococcus* sp. However, LAB composed mainly of *Lactobacillus* sp. represented the following group most resistant after pseudomonads and psychrotrophs exhibiting a strong resistance to chlorhexidine and triclosan, and medium resistance to benzalkonium chloride and PHMG. Disinfectant-resistant LAB may survive after disinfection and cause spoilage problems, moreover resistant LAB may potentially act as genetic sources for resistance genes and thus may contribute to the dissemination of resistance as it was reported by Sidhu et al. (2001).

Disinfectants based on quaternary ammonium (QAC) such as benzalkonium chloride are widely used in the food industry, and are known to be effective against various pathogens like *L. monocytogenes* (Van de Weyer et al., 1993); in this study, no resistant *L. monocytogenes* isolates were detected throughout meat processing which suggest the absence of this bacteria throughout meat processing or its high sensitivity to all antimicrobials used in this study. However, we detected low percentage of staphylococci especially in sacrifice room and white room where handling may have favoured the selection of those microorganisms being resistant to oxonia 6P, triclosan, and hexachlorophene but not to quaternary ammonium compounds. In this condition, no resistant *Staphylococcus* sp. strains were isolated in the presence of quaternary ammonium compounds and biguanides (PHMG and chlorhexidine), in spite of the reported resistance of staphylococci to quaternary ammonium compounds in meat products (Heir et al., 1999; Sundheim et al., 1992). On the other hand, the highest number of resistant *E. coli* was obtained in sacrifice room followed by cutting room in the presence of benzalkonium chloride, indicating that fecal contamination during the slaughter process cannot be completely prevented in spite of the fairly high hygienic standards in most developed countries. However, we could not detect *E. coli* in the end products (MP) which presented mainly psychrotrophs including pseudomonads able to proliferate at lower temperatures. The extensive use of QAC-based disinfectants in the food processing industry has created the potential for selection and spread of resistant microorganisms.

Chlorhexidine is a bisbiguanide antiseptic, disinfectant and preservative effective against a wide range of bacteria, some fungi and viruses (Reynolds, 1996). Chlorhexidine is widely used in combination with cetrimide as a general disinfectant (Levy, 1998). The data obtained in the current study indicated that psychrotrophs -highly represented by Gram-negative bacteria- and pseudomonads showed a strong resistance to this biocide in comparison with other microbial groups. Our results are consistent with those of Russell and Chopra (1996) which reported that chlorhexidine was more effective against Gram-positive than Gram-negative bacteria especially *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus* spp. Previously, Thomas et al. (2000) reported that *Pseudomonas aeruginosa* exhibited an intrinsic resistance to chlorhexidine which was due to their outer membrane as barrier (Guérin-Méchin et al., 2004), by the contrary *E. coli* was less resistant (Thomas et al., 2000) and in the present study we could detect only a very low percentage of resistant isolates (one isolate). However, LAB curiously exhibited the highest percentage of resistant isolates to chlorhexidine in comparison with other biocides (11 isolates).

Concerning resistance to antibiotics, this was highly dependent on bacterial group; however, psychrotrophs non-pseudomonads, *Pseudomonas* sp. and LAB showed high percentage of resistance to erythromycin, cefuroxime and amoxicillin. On the other hand, staphylococci showed a medium resistance to amoxicillin and cefuroxime, and *E. coli* to amoxicillin and erythromycin. In general, the resistance to beta-lactam antibiotics (amoxicillin and cefuroxime) exhibited by all bacterial groups is related to the use of those antimicrobial in veterinary as therapeutic agents and the selection of resistant microorganisms may be a result of genetic transfer of resistance determinants potentiated by the use of disinfectant especially the quaternary ammonium compounds, chlorhexidine and triclosan. In this sense, further studies are required especially in psychrotrophs, pseudomonads and LAB with the aim to elucidate if there is a cross resistance between quaternary ammonium compounds and beta-lactam antibiotics by screening of resistance genes like *qacA*, *qacB*, *qacG*, etc. in beta-lactam resistant isolates or a co-resistance between both antimicrobials. It was found that some staphylococcal strains harboured on the same plasmid both *qacA/B* and *blaZ* genes; thus, linkage between resistance to disinfectants and penicillin occurred frequently in clinical isolates (Sidhu et al., 2002). On the other hand, it was reported that multiresistant bacteria contained integrons with various antibiotic resistance cassettes, including genes encoding broad-spectrum lactamases (Jeong et al., 2009), associated with *qac* genes. However, study carried out by Sidhu et al. (2001) demonstrated no linkage between QAC and antibiotic resistance determinants indicating that the resistance genes could potentially be transferred to pathogens under selective stress and that the presence of both resistance determinants could lead to co-selection during antimicrobial therapy or disinfection in hospitals or in food industries. In the current study, the frequencies of resistance to beta-lactam antibiotics (amoxicillin and cefuroxime) and the quaternary ammonium compounds (chlorhexidine and triclosan) were significantly higher and should be investigated in depth. Moreover, a cross resistance of biocides and antibiotics was also reported in LAB isolated from food processing equipment (Köljalg et al., 2002; Russell et al., 1998; Sidhu et al., 2001). The *blaZ*  $\beta$ -lactamase gene is one of the mechanisms that confer resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in staphylococci, and *qacA/B* and *blaZ* usually reside on common plasmids (Anthonisen et al., 2002).

Correlation of different parameters was done using a statistical tool "Principal component analysis" (PCA) which determined that quaternary ammonium compounds and hexadecylpyridinium were the most relevant biocides in resistant *Pseudomonas* sp., while ciprofloxacin and hexachlorophene were more relevant in psychrotrophs, LAB, and in lesser extent *Staphylococcus* sp. and *Escherichia coli*. On the other hand, PCA of sampling zones determined that sacrifice room (SR) and cutting room (CR) considered as main source of antibiotic and/or biocide resistant bacteria showed an opposite behaviour concerning relevance of antimicrobials to determine resistance being hexadecylpyridinium, cetrinide and chlorhexidine the most relevant in CR, while hexachlorophene, oxonia 6P and PHMG the most relevant in SR. So, rotational use of the relevant biocides as disinfectants in CR and SR is recommended in an environment which is frequently disinfected with the aim to avoid the emergence of resistant bacteria in those areas.

In conclusion, to avoid development of resistance or selection of resistant strains in lamb and goat slaughterhouse especially in sacrifice and cutting rooms, rotational use of different disinfectants is recommended in an environment which is frequently disinfected. Furthermore, continued surveillance throughout the food production continuum is needed to detect emerging resistance phenotypes. Another alternative could be used in those areas is a search for other treatments that can replace the traditional methods of disinfection like ozone or bacteriocins (Cabo et al., 2009). On the other hand, to understand the strategy of development and spread of potential resistant bacteria to both biocides and antibiotics via food chain and thus to human, more knowledge is required about the occurrence and maintenance of resistance determinants in microorganisms resistant to antimicrobial compounds

in the food processing industry. To accomplish this, both the identification at species level of all resistant bacteria and characterization in depth of resistance mechanisms are needed.

## Acknowledgements

This work was supported by grants AGL2009-08921, P08-AGR-4295, Plan propio de la Universidad de Jaén, and Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario CeiA3. Leyre Lavilla Lerma was beneficiary of a fellowship from Spanish Ministry of Education and Science.

## References

- Abriouel, H., Lucas, R., Ben Omar, N., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A., 2005. Enterocin AS-48R: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 383–397.
- Ahn, Y.T., Lim, K.L., Ryu, J.C., Kang, D.K., Ham, J.S., Jang, Y.H., Kim, H.U., 2002. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* isolated from piglets and chicken. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 15, 1790–1792.
- Anthonisen, I.-L., Sunde, M., Steinum, T.M., Sidhu, M.S., Sørum, H., 2002. Organization of the antiseptic resistance gene *qacA* and Tn552-related  $\beta$ -lactamase genes in multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* strains of animal and human origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 3606–3612.
- Atlas, R.M., Parks, L.C., 1993. *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press, Inc., London.
- Behr, H., Reverdy, M.E., Mabelat, C., Freney, J., Fleurette, J., 1994. Relation entre le niveau des concentrations minimales inhibitrices de cinq antiseptiques et la présence du gène *qacA*. *Pathologie et Biologie* 42, 438–444.
- Borck, B., Pedersen, K., 2005. Pulsed-field gel electrophoresis types of *Campylobacter* spp. in Danish 456 turkeys before and after slaughter. *International Journal of Food Microbiology* 101, 63–72.
- Cabo, M.L., Herrera, J.J., Crespo, M.D., Pastoriza, L., 2009. Comparison among the effectiveness of ozone, nisin and benzalkonium chloride for the elimination of planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* CECT4459 on polypropylene. *Food Control* 20, 521–525.
- Chen, Y., Knabel, S.J., 2007. Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *L. monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6299–6304.
- Chuanchien, R., Beinlich, K., Hoang, T.T., Becher, A., Karkhoff-Schweitzer, R.R., Schweizer, H.P., 2001. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects for *nfxB* mutants overexpressing MexCD-Opj. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 428–432.
- Ciusa, M.L., Furi, L., Knight, D., Decorosi, F., Fondi, M., Raggi, C., Rosado Coelho, J., Aragones, L., Moce, L., Visa, P., Freitas, A.T., Baldassarri, L., Fani, R., Viti, C., Orefici, G., Martinez, J.L., Morrissey, I., Rinaldo Oggioni, M., the BIOHYPO Consortium, 2012. A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 40, 210–220.
- CLSI, 2009. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- Cosgrove, S.E., 2006. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clinical Infectious Diseases* 42, S82e89.
- Dixon, B., 2000. Antibiotics as growth promoters: risks and alternatives. *ASM News* 66, 264–265.
- Dutka-Malen, S., Evers, S., Courvalin, P., 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 24–27.
- EFSA, 2008. Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA Journal* 732, 1–15.
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P., Villani, F., 2009. Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1990–2001.
- Fazlara, A., Ekhtelat, M., 2012. The disinfectant effects of benzalkonium chloride on some important foodborne pathogens. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 12, 23–29.
- Feinman, S.E., 1999. Antibiotics in animal feeds—drug resistance revisited. *ASM News* 64, 24–29.
- Fraser, J.A., Sperber, W.H., 1988. Rapid detection of *Listeria* sp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. *Journal of Food Protection* 51, 762–765.
- Gilbert, P., Allison, D.G., McBain, A.J., 2002. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance. *Journal of Applied Microbiology* 92, 98s–110s.
- Giolitti, C., Cantoni, C., 1966. A medium for the isolation of staphylococci from food-stuffs. *The Journal of Applied Bacteriology* 29, 395–398.
- Guérin-Méchin, L., Leveau, J.-Y., Dubois-Brissonnet, F., 2004. Resistance of spheroplasts and whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* to bactericidal activity of various biocides: evidence of the membrane implication. *Microbiological Research* 159, 51–57.

- Gutmann, L., Williamson, R., Moreau, N., 1985. Cross-resistance to nalidixic acid, trimethoprim, and chloramphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia*. The Journal of Infectious Diseases 151, 501–507.
- Heinzel, M., 1998. Phenomena of biocide resistance in microorganisms. International Biodeterioration and Biodegradation 41, 225–234.
- Heir, E., Sundheim, G., Holck, A.L., 1999. Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistant staphylococci from the food industry. International Journal of Food Microbiology 48, 211–219.
- Hugo, W.B., 1977. Phenols: a review of their history and development as antimicrobial agents. Microbios 23, 83–85.
- Hugo, W.B., 1978. Early studies in the evaluation of disinfectants. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 4, 489–494.
- Hugo, W.B., 1981. The mode of action of antiseptics. In: Weuffen, W., Kramer, A., Gröschel, D., Berenci, G., Bulka, E. (Eds.), Handbuch der Antiseptik. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, pp. 39–77.
- Hugo, W.B., 1991. A brief history of heat and chemical preservation and disinfection. The Journal of Applied Bacteriology 71, 9–18.
- Jensen, L.B., Ahrens, P., Dons, L., Jones, R.N., Hammerum, A.M., Möller Aarestrup, F., 1998. Molecular analysis of Tn1546 in *Enterococcus faecium* isolated from animals and humans. Journal of Clinical Microbiology 36, 437–442.
- Jeong, J.H., Shin, K.S., Lee, J.W., Park, E.J., Son, S.Y., 2009. Analysis of a novel class 1 integron containing metallo-lactamase gene VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Microbiology 47, 753–759.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E., 1954. Media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine 44, 301–307.
- Köljal, S., Naaber, P., Mikelsaar, M., 2002. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. The Journal of Hospital Infection 51, 106–113.
- Kraft, A.A., 1992. Psychrotrophic Bacteria in Foods: Disease and Spoilage. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Levy, S.B., 1997. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. Ciba Foundation Symposium 207, 1–9.
- Levy, S.B., 1998. The challenge of antibiotic resistance. Scientific American 278, 22–39.
- Levy, S.B., 2002. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. Journal of Applied Microbiology 92, 65s–71s.
- Ma, D., Cook, D.N., Hearst, J.E., Nikaido, H., 1994. Efflux pumps and drug resistance in gram-negative bacteria. Trends in Microbiology 2, 489–493.
- Magee, J.T., Pritchard, E.L., Fitzgerald, K.A., Dunstan, F.D.J., Howard, A.J., 1999. Antibiotic prescribing and antibiotic resistance in community practice: retrospective study, 1996–8. British Medical Journal 319, 1239–1240.
- Marcos, J.Y., Soriano, A.C., Salazar, M.S., Moral, C.H., Ramos, S.S., Smeltzer, M.S., Carrasco, G.N., 1999. Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *araA* gene. Journal of Clinical Microbiology 37, 570–574.
- Mayer, S., Boos, M., Beyer, A., Fluit, A.C., Schmitz, F.-J., 2001. Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant European isolates of *Staphylococcus aureus*. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 47, 896–897.
- McCallum, N., Berger-Bächi, B., Senn, M.M., 2010. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. International Journal of Medical Microbiology 300, 118–129.
- Meyer, E., Lunke, C., Kist, M., Schwab, F., Frank, U., 2008. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from food, animals and humans in Germany. Infection 36, 59–61.
- Miles, T.D., McLaughlin, W., Brown, P.D., 2006. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. BMC Veterinary Research 2, 7.
- Morot-Bizot, S.C., Talon, R., Leroy, S., 2004. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. Journal of Applied Microbiology 97, 1087–1094.
- Munsch-Alatossava, P., Alatossava, T., 2007. Antibiotic resistance of raw milk associated psychrotrophic bacteria. Microbiological Research 162, 115–123.
- Padungtod, P., Kaneene, J.B., Hanson, R., Morita, Y., Boonmar, S., 2006. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolated from food animals and humans in northern Thailand. FEMS Immunology and Medical Microbiology 47, 217–225.
- Peyrat, M.B., Soumet, C., Maris, P., Sanders, P., 2008. Phenotypes and genotypes of campylobacter strains isolated after cleaning and disinfection in poultry slaughterhouses. Veterinary Microbiology 128, 313–326.
- Reverdy, M.E., 1995. Les ammonium quaternaires. In: Fleurette, J., Freney, J., Reverdy, M.E. (Eds.), Antiseptie et Désinfection. Editions ESKA, Paris, pp. 174–198.
- Reynolds, J.E.F., 1996. Martindale: The Extra Pharmacopoeia, The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London, 31th ed., pp. 1124–1126.
- Romanova, N.A., Gawande, P.V., Brovko, L.Y., Griffiths, M.W., 2007. Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. Journal of Microbiological Methods 71, 231–237.
- Russell, A.D., 2000. Do biocides select for antibiotic resistant bacteria? The Journal of Pharmacy and Pharmacology 52, 227–233.
- Russell, A.D., 2002. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. Journal of Applied Microbiology 92, 121s–135s.
- Russell, A.D., Chopra, I., 1996. Understanding Antibacterial Action and Resistance, 2nd ed. Ellis Horwood, Hertfordshire, pp. 28–206.
- Russell, A.D., McDonnell, G., 2000. Concentration: a major factor in studying biocidal action. The Journal of Hospital Infection 44, 1–3.
- Russell, A.D., Tattawasart, U., Mailard, J.-Y., Furr, J.R., 1998. Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42, 2151.
- Safdar, N., Maki, D.G., 2002. The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, gram-negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. Annals of Internal Medicine 136, 834–844.
- Sathish, S., Swaminathan, K., 2008. Veterinary anaerobes & diseases molecular characterization of the diversity of *Clostridium chauvoei* isolates collected from two bovine slaughterhouses: analysis of cross-contamination. Anaerobe 14, 190–199.
- SCAN, 1996. Report of the Scientific Committee for Animal Nutrition (SCAN) on the possible risk for humans on the use of avoparcin as feed additive. Opinion expressed 21 May 1996. Office for EC Publications, Luxembourg.
- SCAN, 1998. Opinion of the Scientific Committee for Animal Nutrition (SCAN) on the immediate and long-term risk to the value of streptogramins in human medicine posed by the use of virginiamycin as an animal growth promoter. Office for EC Publications, Luxembourg. (10 July 1998).
- Seidavi, A., Mirhosseini, Seyed Ziaeddin, Shivazad, M., Chamani, M., Asghar Sadeghi, A., Pourseify, R., 2010. Detection and investigation of *Escherichia coli* in contents of duodenum, jejunum, ileum and cecum of broilers at different ages by PCR. Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 18, 321–326.
- Sidhu, M.S., Langsrud, S., Holck, A., 2001. Disinfectant and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from the food industry. Microbial Drug Resistance 7, 73–83.
- Sidhu, M.S., Heir, E., Leegaard, T., Wiger, K., Holck, A., 2002. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46, 2797–2803.
- Singh, A.K., Ramesh, A., 2008. Succession of dominant and antagonistic lactic acid bacteria in fermented cucumber: insights from a PCR-based approach. Food Microbiology 25, 278–287.
- Sundheim, G., Hagtvedt, T., Dainty, R., 1992. Resistance of meat associated staphylococci to a quaternary ammonium compound. Food Microbiology 9, 161–167.
- Szita, G., Biró, G., 1986. A new synthetic, selective, liquid medium for determination of coliform bacteria. Acta Veterinaria Hungarica 34, 145–149.
- Teuber, M., 1999. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. Cellular and Molecular Life Sciences 56, 755–763.
- Thomas, L., Maillard, J.-Y., Lambert, R.J.W., Russell, A.D., 2000. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a 'residual' concentration. The Journal of Hospital Infection 46, 297–303.
- Threlfall, E.J., Ward, L.R., Frost, J.A., Willshaw, G.A., 2000. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. International Journal of Food Microbiology 62, 1–5.
- Threlfall, E.J., Teale, C.J., Davies, R.H., Ward, L.R., Skinner, J.A., Graham, A., Cassar, C., Speed, K., 2003. A comparison of antimicrobial susceptibilities in nontyphoidal salmonellas from humans and food animals in England and Wales in 2000. Microbial Drug Resistance 9, 183–189.
- Van de Weyer, A., Devleeschouwer, M.J., Dony, J., 1993. Bactericidal activity of disinfectants on *Listeria*. The Journal of Applied Bacteriology 74, 480–483.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173, 697–703.
- White, D.G., Zhao, S., Simjee, S., Wagner, D.D., McDermott, P.F., 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. Microbes and Infection 4, 405–412.
- Yadav, J.S., Khan, I.U.H., Fakhari, F., Soellner, M.B., 2003. DNA-based methodologies for rapid detection, quantification, and species- or strain-level identification of respiratory pathogens (*Mycobacteria* and *Pseudomonads*) in metalworking fluids. Applied Occupational and Environmental Hygiene 18, 966–975.

## **APORTACIÓN 2**

**Leyre Lavilla Lerma, Nabil Benomar, Charles W. Knapp, David Correa Galeote, Antonio Gálvez, and Hikmate Abriouel. 2014. Diversity, distribution and quantification of antibiotic resistance genes in goat and lamb slaughterhouse surfaces and end products. Enviado a Plos one.**



# Diversity, distribution and quantification of antibiotic resistance genes in goat and lamb slaughterhouse surfaces and end products.

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	PONE-D-14-22302R1
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Full Title:</b>	Diversity, distribution and quantification of antibiotic resistance genes in goat and lamb slaughterhouse surfaces and end products.
<b>Short Title:</b>	Quantification of antibiotic resistance genes in slaughterhouse.
<b>Corresponding Author:</b>	Hikmate Abriouel, Ph.D University of Jaén Jaén, Jaé SPAIN
<b>Keywords:</b>	Antibiotic resistance genes, slaughterhouse,tetracycline, beta lactamase, sulfonamide, quantitative PCR.
<b>Abstract:</b>	<p>The distribution and quantification of tetracycline, sulfonamide and beta-lactam resistance genes were assessed in slaughterhouse zones throughout meat chain production and the end products; this study represents the first to report quantitatively monitor antibiotic resistance genes (ARG) in goat and lamb slaughterhouse using a culture independent approach, since most studies focused on individual bacterial species and their specific resistance types. Quantitative PCR (qPCR) revealed a high prevalence of tetracycline resistance genes tetA and tetB in almost all slaughterhouse zones. Sulfonamide resistance genes were largely distributed, while beta-lactam resistance genes were less predominant. Statistical analysis revealed that resistant bacteria, in most cases, were spread by the same route in almost all slaughterhouse zones, except for tetB, blaCTX and blaTEM genes, which occurred in few zones as isolated 'hot spots.' The sum of all analyzed ARG indicated that slaughterhouse surfaces and end products act as reservoirs of ARG, mainly tet genes, which were more prevalent in slaughtering room (SR), cutting room (CR) and end products (MP). Resistance gene patterns suggest they were disseminated throughout slaughterhouse zones to end products, with significant correlations between different sampling zones/end products and total resistance in SR, CR and white room (WR) zones, and also refrigerator 4 (F4) and MP were observed. Strategically controlling key zones in slaughterhouse (SR, CR and WR) by adequate disinfection methods could strategically reduce the risks of ARG transmission and minimize the issues of food safety and environment contamination.</p>
<b>Order of Authors:</b>	Leyre Lavilla Lerma Nabil Benomar Charles W. Knapp David Correa Galeote Antonio Gálvez Hikmate Abriouel, Ph.D
<b>Suggested Reviewers:</b>	Charles Franz, PhD. Max Rubner-Institut charles.franz@mri.bund.de He worked with antibiotic resistance in different bacteria.  Carmen Torres Manrique, PhD. Universidad de la Rioja carmen.torres@unirioja.es She is an expert in antibiotic resistance.
<b>Opposed Reviewers:</b>	
<b>Response to Reviewers:</b>	5. Review Comments to the Author

1    **Diversity, distribution and quantification of antibiotic resistance genes in goat and**  
2    **lamb slaughterhouse surfaces and end products**

3  
4    Leyre Lavilla Lerma<sup>1</sup>, Nabil Benomar<sup>1</sup>, Charles W. Knapp<sup>2</sup>, David Correa Galeote<sup>3</sup>,  
5    Antonio Gálvez<sup>1</sup>, and Hikmate Abriouel<sup>1\*</sup>

6    <sup>1</sup>*Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias*  
7    *Experimentales, Universidad de Jaén, 23071-Jaén, Spain.*

8    <sup>2</sup>*Department of Civil and Environmental Engineering, University of Strathclyde,*  
9    *Glasgow, Scotland, United Kingdom.*

10    <sup>3</sup>*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación*  
11    *Experimental del Zaidín, Agencia CSIC, Granada, Spain.*

12  
13  
14    *\*Corresponding author. Present address: Área de Microbiología. Departamento de*  
15    *Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales. Edif. B3. Universidad de*  
16    *Jaén. Campus Las Lagunillas s/n. 23071-Jaén, Spain. Tel.: 34-953-212003; fax: 34-*  
17    *953-212943.*

18    E-mail address: hikmate@ujaen.es

19

## Abstract

The distribution and quantification of tetracycline, sulfonamide and beta-lactam resistance genes were assessed in slaughterhouse zones throughout meat chain production and the end products; this study represents the first to report quantitatively monitor antibiotic resistance genes (ARG) in goat and lamb slaughterhouse using a culture independent approach, since most studies focused on individual bacterial species and their specific resistance types. Quantitative PCR (qPCR) revealed a high prevalence of tetracycline resistance genes *tetA* and *tetB* in almost all slaughterhouse zones. Sulfonamide resistance genes were largely distributed, while beta-lactam resistance genes were less predominant. Statistical analysis revealed that resistant bacteria, in most cases, were spread by the same route in almost all slaughterhouse zones, except for *tetB*, *bla<sub>CTX</sub>* and *bla<sub>TEM</sub>* genes, which occurred in few zones as isolated ‘hot spots.’ The sum of all analyzed ARG indicated that slaughterhouse surfaces and end products act as reservoirs of ARG, mainly *tet* genes, which were more prevalent in slaughtering room (SR), cutting room (CR) and end products (MP). Resistance gene patterns suggest they were disseminated throughout slaughterhouse zones to end products, with significant correlations between different sampling zones/end products and total resistance in SR, CR and white room (WR) zones, and also refrigerator 4 (F4) and MP were observed. Strategically controlling key zones in slaughterhouse (SR, CR and WR) by adequate disinfection methods could strategically reduce the risks of ARG transmission and minimize the issues of food safety and environment contamination.

## Introduction

Antibiotics have been routinely used for therapy, prophylaxis, animal growth promotion and in agricultural operations for several decades. However, the over- or in-appropriate use results in the selection of drug-resistant pathogens and commensals in animals and the environment [1], with resistant microorganisms spreading through water and food chain. As such, the prevalence and distribution of antibiotic-resistant bacteria (ARB) have become a threat to food safety; the surveillance and control of spread of antibiotic resistance genes (ARG) throughout food chain has great relevance since consumers are increasingly aware of concerns over antibiotic resistant bacteria in foods, especially those of animal origin. Furthermore, several studies unequivocally supported the concern that use of antibiotics in veterinary or in food animals (particularly non-therapeutic use) impacts the health of people on farms and within the food chain [2-7].

There is a growing interest in ecological studies of antimicrobial resistance in foodborne bacteria. Those bacteria are considered potential reservoirs of resistance as a consequence of the complex transmission routes between farms and consumers. The frequent transfer of resistance genes among host bacteria is becoming more evident with molecular studies, which have shown the distribution of the same gene in different bacteria of animal or human origin [7]. For example, the spread of ARG from animals to humans could be enhanced within the food matrix and also within the human gastrointestinal tract [8-10] by horizontal gene transfer of mobile elements such as plasmids, transposons, integrons or phages [11-13]. In fact, serious public health hazards arise because of the ability of many bacteria to acquire resistance traits to different antimicrobials.

Smith DeWaal and Vaughn Grooters [14] report that there has been a significant increase in sales and distribution of the highly important classes of antibiotics (tetracyclines, beta-lactams and sulfonamides) frequently used for therapeutic and prophylactic purposes in food-producing animals. A recent increase in antibiotic-resistant foodborne outbreaks highlights the emergence of resistance [14]. However, the information available on the incidence of resistance in foodborne bacteria is mainly based on phenotypic tests and culture-dependent methods; quantification of ARG in food samples by culture-independent methods should also be used to reveal if there is any real increase in resistance potential. The main goal of the present study was to



quantitatively track the frequency and the distribution of ARG in different slaughterhouse surfaces throughout meat chain production (and in the end products) by quantitative real-time PCR for tetracycline, beta-lactam and sulfonamide resistance genes. Furthermore, the present study determines whether relationships exist between different ARG, and their source locations.

## **Material and Methods**

### **Samples**

The samples were collected from a local goat and lamb slaughterhouse that is representative of the region (Jaén, Spain), as described in a previous study by Lavilla Lerma et al. (2013). Standard cleaning and disinfection procedures were applied to sampling areas 12 h before the sampling. Briefly, different samples were collected with sterile swabs from 100-cm<sup>2</sup> surfaces in the following zones: entrance (E), slaughtering-room (SR), refrigerator (F), cutting-room (CR), freezing-tunnel (FrT) and white-room (WR, where meat products were packaged under controlled environmental conditions). The samples were transported at 4°C to the laboratory, where sterile swabs were then immersed in 10 ml of sterile BHI (Brain Heart Infusion, Scharlab, Barcelona, Spain) broth and incubated at 22°C for 24 h [15]. For the present study, 1 ml of samples (each one in duplicate) was centrifuged and the pellets were subjected to DNA extraction. In addition to slaughterhouse surfaces, we examined five meat products (MP; MP1, minced beef; MP2-MP4, ham; MP5, cooked ham) from different supermarkets in Jaén (Spain). Meat product samples (5 g each) were diluted in 45 ml of sterile saline solution (0.85%), homogenized for 3 min in a Stomacher 80 (Biomaster) and then 1 ml of this mixture was added to 9 ml BHI and incubated at 22°C for 4 h. The samples were processed, as described above, for slaughterhouse samples.

### **DNA extraction**

Total DNA was extracted from the pellets of all samples analyzed in the present study by the method described by De los Reyes-Gavilan et al. [16]. Quality of DNA samples was checked spectrophotometrically and then diluted 1/10 with molecular biology grade water. The integrity of nucleic acids was assessed by electrophoresis of 2 µl of each sample through a 1.2% agarose-TBE gel as described by Sambrook et al. [17].

### **Real-time PCR assays for quantification of tetracycline, beta-lactam and sulfonamide resistance genes**

The distribution of nine gene determinants targeting tetracycline resistance (*tet*), extended-spectrum beta-lactamases (*bla*), and sulfonamide resistance (*sul*) were selected on the basis of the reported incremented resistance to such antibiotics in foodborne bacteria. In particular, the following gene determinants were assayed: two beta-lactam resistance genes (*bla<sub>TEM</sub>* and *bla<sub>CTX</sub>*), four tetracycline resistance gene determinants (*tetA*, *tetB*, *tetO* and *tetQ*) and three determinants of sulfonamide resistance (*sulI*, *sulII* and *sulIII*), and *pheS* (phenylalanyl-tRNA synthase) gene universally present in all bacteria as a surrogate measure of bacterial abundance. These genetic markers were selected as bio-indications of relative, potential risks of ARB contamination in slaughterhouse. For each resistance determinant, duplicate 25 µl reaction mixtures including 3.75 µl of DNA template (1/10), 1.25 µl of primer mixture at 10 mM (for each forward and reverse primer, Table 1), 12.5 µl of 2x qPCR Master Mix with SYBR Green for the BioRad iCycler (Primer design Ltd, Southampton, United Kingdom) and 7.5 µl molecular-grade water were analyzed. Analyses were performed using a BioRad iQ5 Real Time PCR Detection System and software (BioRad, Hercules, CA). Reaction conditions included initial denaturation at 95°C (1 min 30 sec for all resistance genes and 2 min for *pheS* gene), and then 40 cycles of 95°C (30 sec) for *tet* and *sul* genes, 50 cycles of 95°C (30 sec) for *bla<sub>TEM</sub>* and 45 cycles of 95°C (30 sec) for *bla<sub>CTX</sub>* gene and 35 cycles of 95°C (1 min) for *pheS* gene, annealing temperatures (X°C, Table 1) for 30 sec, and 72°C for 30 sec for all genes except *pheS* (for 35 sec).

All reactions were run with serially diluted specific standards of known quantity for each gene as described elsewhere (Table 1) including negative control in each run. The standard curve was generated by cloning gene segments into a plasmid vector (TOPO-TA, Invitrogen-Life Technologies). Plasmids were purified (Plasmid Mini Kit, Qiagen) and the DNA quantified with a UV spectrophotometer (NanoDrop 1000; Thermo Scientific, United Kingdom), and serially diluted to generate concentrations for standard curve [18]. Correlation coefficients ( $r^2$ ) for the standards curves were >0.99 for calibration curves, the efficiency varied from 95 to 103% and *log* gene abundance values were always within the linear range of detection. Antibiotic resistance gene (ARG) abundances were normalized to *pheS* housekeeping gene abundances (a surrogate measure of ‘total bacteria’) [19] to minimize variance caused by differential extraction and analytical efficiencies, and differences in background bacterial

abundances. These normalized values were then *log*-transformed to apply the Kolmogorov-Smirnov test for normality.

### **Statistical analysis**

All statistics were conducted using IBM SPSS Statistics version 19. Values of ARG *log*-transformed among the studied zones were compared to determine significant differences between them by a Tukey or a Games Howell test, depending to the Levene test value. The ARG values for a given zone that had a *p*-value of  $< 0.05$  were considered statistically significantly different.

To investigate the relationship between relative abundances in different zones or different genes, Pearson correlation coefficients (*r*) were calculated; this determined the extent to which values of two variables (zones or genes) were linearly similar. Categorization of correlations between different antimicrobials was based on Dancey and Reidy [20]; the strength of correlation was consider 'strong' when  $r > 0.7$ , moderate when  $0.4 < r < 0.6$ , and weak with  $r < 0.3$ . In all analyses, a *P* value of  $< 0.05$  was considered significant for two-tailed tests.

## Results and Discussion

### Spatial variations of antibiotic resistance gene abundances in goat and lamb slaughterhouse

Slaughterhouses comprise several zones where meat and product processing occur, and each zone has characteristic environmental conditions and surface exposures that may influence bacteria presence and retention. The flow of ARB and their ARG throughout meat chain production has been documented in the literature, mainly in poultry and swine slaughterhouses [21-23], and many studies have focused on individual bacteria species and specific resistance traits [24,25]. To our knowledge, this is the first report of the monitoring of antibiotic resistance in the total microbiota present in goat and lamb slaughterhouse.

Many slaughterhouse surfaces were found to harbor different ARG. PCR detected ARG in all zones (Fig. 1), with the entrance (E) and freezing tunnel (FrT) being zones having the least resistance diversity detected (four of nine determinants, 44%). Greatest diversities were found within the SR (slaughtering room) and CR (cutting room), where surfaces had 8/9 gene determinants. In terms of gene frequency on surfaces, the most widely distributed genes were *sulIII* (found on 25 surfaces, 78% of the total sampled) and *sulII-sulIII-tetB* (18-20 surfaces, 56-63%), while gene *tetO* (only in 5 surfaces, 16%) was detected least frequently (Figs. 1-4). The *tetB* gene was the most prevalent being detected in 20 of the 32 surfaces analyzed (8 of 9 zones analyzed), followed by *tetA* and *tetQ* genes (14-15 samples of 6-7 zones) and *tetO* (8 samples of 4 zones) (Fig. 2); it, however, was not detected in the entrance (zone E) (Figs. 1, 2B). Concerning end products (MP), *sulIII* and *tetA* genes were detected in all or almost all samples, respectively, while *bla<sub>CTX</sub>* was absent in all meat samples analyzed (Figs. 1-4).

The distribution and broad presence of gene determinants creates great concern, considering the potential risks associated with the spread of ARG throughout meat chain production to end products. Although slaughtering and meat handling operations follow rigorously good hygienic practices, the risk of surface and end products contamination with ARB may occur.

To better understand the risks and the patterns of gene dissemination, measurements of genes were further evaluated quantitatively. Absolute abundances represent total genes swabbed per surface area (Figure 5). Highest abundances were obtained with tetracycline genes, mainly *tetB* and *tetQ* genes, which averaged (geometric mean)  $10^{5.5}$  and  $10^{4.8}$  genes/cm<sup>2</sup> over the nine slaughterhouse zones, respectively (Fig. 5A). While *tetA* and *tetO* showed an average of  $10^{3.4}$  and  $10^{2.9}$  genes/cm<sup>2</sup>, respectively (Fig. 5A). Regarding *sul* gene abundances in slaughterhouse, *sulII* was the most abundant ( $10^{4.4}$  genes/cm<sup>2</sup>), followed by *sulI* ( $10^4$  genes/cm<sup>2</sup>) and *sulIII* ( $10^{3.1}$  genes/cm<sup>2</sup>) (Fig. 5B). Similarly, beta-lactam resistance gene *bla<sub>TEM</sub>* exhibited  $10^{3.0}$  genes/cm<sup>2</sup>, while *bla<sub>CTX</sub>* was less abundant ( $10^{1.0}$  genes/cm<sup>2</sup>) (Fig. 5C). When analysis was done with end products, higher densities of all ARG except *bla<sub>CTX</sub>* were obtained (Fig. 5).

To approximate the percent resistance of total bacteria, ARG values were normalized by *pheS* values to provide relative abundances (Figures 2-4). Different determinants of the *tet* genes differed in prevalence among all slaughterhouse zones analyzed and even between samples recovered from surfaces within the same zone, thus strong spatial variations were detected depending on the ARG and location (Fig. 2). Relative concentrations of *tetB* gene were higher in almost all surfaces, oscillating between  $10^{1.80}$  and  $10^0$  (genes/*pheS*) with gene densities more noticeable in SR, CR, F2, F3, F4 and WR (Fig. 2B). However, we only detected *tetB* gene in one sample of end products (MP2). Similarly, *tetA* gene was detected in all zones except F1, Frt and F4 zones (Figs. 1 and 2A). Relative concentrations of *tetA* gene were higher in both samples S4 and S9 of SR zone (approximately  $10^0$  genes/*pheS*), followed by S13 and S14 of CR zone ( $10^{0.5}$  and  $10^{-0.4}$  genes/*pheS*), S21 of F2 zone and MP4 (about  $10^{-0.7}$  and  $10^{-0.8}$  genes/*pheS*, respectively) (Fig. 2A). Furthermore, we detected *tetA* gene in other surfaces (S1, S2, S3, S6, S8, S18, S19, S20, S22 and S30) belonging to different slaughterhouse zones (E, SR, CR, F3 and WR) and also end products (MP1, MP2 and MP3) (ranging between  $10^{3.0}$  and  $10^{-1.1}$  genes/*pheS*) (Fig. 2A).

Lavilla Lerma et al. [15] showed that the same goat and lamb slaughterhouse contained Gram negative bacteria (about 73% of which were *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli* and non-identified Gram negative psychrotrophs), so the high prevalence of *tetA* and *tetB* genes (each encoding an efflux pump) was in agreement with those who reported tetracycline resistance in individual Gram negative bacteria isolated from animal foods

and slaughterhouse environments [26-28]. Additionally the diversity of *tet* genes and their genetic mobility contribute significantly to their dissemination among many different bacteria [29].

Regarding tetracycline-resistance genes that encode ribosomal protection proteins (*tetO* and *tetQ*), they are commonly found in intestinal tracts of cattle and also in the environment; their quantification results were variable. *TetO* was only detected in CR, F3, FrT, WR and meat products (Fig. 2C) and the relative concentrations oscillated between  $10^{-0.74}$  and  $10^0$  (*tetO/pheS*) (Fig. 2C). However, *tetQ* gene was distributed throughout slaughterhouse surfaces except F1 and CR (Fig. 2D), being highly abundant in E (S1), SR (S7), F2 (S21), FrT (S23), WR (S29) and end product (MP2) (*tetQ/pheS* were almost  $10^0$ ), while in other surfaces (SR, F2, F3, F4 and WR) quantification of *tetQ* gene was variable (Fig. 2D).

The occurrence of *sul* genes varied and occurred in most slaughterhouse zones (Fig. 3A). Comparing relative concentrations of *sul* genes, higher abundances were found with *sulIII* gene ( $10^{-1.3}$  and  $10^0$  *sulIII/pheS*) in most cases (Fig. 3B). However, *sulIII* gene was more disseminated throughout slaughterhouse surfaces until end products (Fig. 3C). The high prevalence of sulfonamide resistance in animals and humans was largely reported all over the world due to the frequent use of those antimicrobials in veterinary, and their spread to humans via food chain was also documented [30,31]. Furthermore, the genetic localization of *sul* genes on mobile elements may explain their wide distribution [32,33].

Concerning beta-lactamases, relative concentrations of *bla<sub>TEM</sub>* gene was quantitatively higher (approximately  $10^0$ ) than *bla<sub>CTX</sub>* and often detected in SR (S10) and WR (S29), and absent in E, F2 and FrT (Fig. 4). However, *bla<sub>CTX</sub>* was not detected in E, F1, F2, F3, FrT and end products (Fig. 4A). The genes *bla<sub>TEM</sub>* and *bla<sub>CTX</sub>* are widespread among Gram-negative pathogens [34]; however, in the present study despite the high prevalence of Gram-negative bacteria in slaughterhouse environment, lower concentrations of beta-lactamase genes were detected in comparison with other genes.

#### **Analysis of total antibiotic throughout meat chain production**

Analyses of resistance genes provide quantitative information for risk assessment in each slaughterhouse zone and also end products. Analysis of the sum of measured tetracycline resistance genes (*tetA*, *tetB*, *tetO* and *tetQ*), sulfonamide resistance genes (*sulI*, *sulII* and *sulIII*) and beta-lactam resistance genes (*bla<sub>TEM</sub>* and *bla<sub>CTX</sub>*) in different slaughterhouse zones and end products showed that tetracycline genes were most prevalent in goat and lamb slaughterhouse zones and meat products (about two and ten orders of magnitude higher than sulfonamide and beta-lactamase groups, respectively) (Fig. 6). This data is not surprising since tetracycline genes are often spread over many promiscuous conjugative genetic elements [29,35], thus detection of *tet* genes was possible in a diversity of environmental bacteria (in soil, sludge, wastewater, river water, and agriculture) [36-40] and foods [41]. The most important reservoir of tetracycline genes were CR, SR and MP, while sulfonamide and beta lactamase groups were mainly observed in SR (Fig. 6).

## Statistical analysis

Statistical analysis of the relative concentrations of each ARG showed that the differences were not significant ( $p>0.05$ ) between slaughterhouse zones and meat products concerning *tetA*, *tetO*, *tetQ*, *sulI*, *sulII* and *sulIII* genes (Table 2). However, the differences in the relative concentrations of *tetB*, *bla<sub>CTX</sub>* and *bla<sub>TEM</sub>* genes were significant ( $p<0.05$ ) among slaughterhouse zones and also meat products (Table 2). The data suggests that resistance could be acquired by a spread of genetic trait through slaughterhouse zones and also meat products; the exception would be *tetB*, *bla<sub>CTX</sub>* and *bla<sub>TEM</sub>* genes, which appear as ‘hot spots’ within the meat processing stream. ARG may migrate with ARB throughout slaughterhouse zones. Besides indirect transmission of resistant bacteria through the food chain by consumption of animal foods, resistance acquisition can occur by direct contact of farms and slaughterhouse workers and veterinarians, which can be other vectors by which ARB are spread to the community and the environment [42].

Significant positive correlations between different sampling zones/end products and the total relative concentrations of ARG were observed in CR and F2, SR or WR; SR and F1 or WR; F1 and F2; MP and F4, while negative correlations were only detected between F1 and F3 (Table 3). Furthermore, *tetQ* positively correlated with *tetO* and



*sull*, however, *tetA* gene negatively correlated with *bla<sub>TEM</sub>* gene (Table 4). In all cases, correlations of ARGs were highly significant ( $p<0.01$  or  $p<0.05$ ). Moreover, a broad relationship between some slaughterhouse zones (mainly between SR, CR and WR) throughout meat chain production indicated flow of resistance genes by handling, carcasses, transport and utensils.

## Conclusions

Slaughterhouse surfaces and end products act as large reservoirs of ARG especially *tet* genes. The greatest risk appears to be located in cutting room (CR) and slaughtering room (SR), with evidence of ARG (and ARB) ending up in end products (MP). These data should importantly be considered to reduce the risk of gene transfer throughout slaughterhouse zones. Furthermore, total resistance in SR, CR and WR zones, and also F4 and MP strongly correlated, suggesting resistance disseminated throughout slaughterhouse zones by carry-over contamination; control of those key zones in slaughterhouse (SR, CR and WR) would be a good strategy to reduce the risks of transmission and avoid food-safety problems with food safety by adequate disinfection methods.

## Acknowledgments

This work was supported by grants AGL2009-08921 (Ministerio de Innovación y Ciencia), P08-AGR-4295 (Junta de Andalucía), Plan propio de la Universidad de Jaén, and Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario CeIA3. Leyre Lavilla Lerma was beneficiary of a fellowship from Spanish Ministry of Education and Science.

## References

1. Wegener HC (2003) Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr Opin Microbiol* 6: 439–445.
2. Barza MD, Gorbach SL (2002) The need to improve antimicrobial use in agriculture: ecological and human health consequences. *Clin Infect Dis* 34: S71-144.
3. Fey PD, Safranek TJ, Rupp ME, Dunne EF, Ribot E et al. (2000) Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *N Engl J Med* 342: 1242–1249.
4. Holmberg SD, Osterholm MT, Senger KA, Cohen ML (1984) Drug-resistant *Salmonella* from animals fed antimicrobials. *N Engl J Med* 311: 617–622.
5. Hummel R, Tschape H, Witte W (1986) Spread of plasmid-mediated nourseothricin resistance due to antibiotic use in animal husbandry. *J Basic Microbiol* 26: 461–466.
6. Levy SB, FitzGerald GB, Macone AB (1976) Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm. *N Engl J Med* 295: 583–588.
7. Marshall BM, Levy SB (2011) Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clin Microbiol Rev* 24: 718–733.
8. Aarestrup FM (2005) Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol* 96: 271–81.
9. Schjørring S, Krogfelt KA (2011) Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. *Int J Microbiol* 2011: 1-10.
10. Stecher B, Denzler R, Maier L, Bernet F, Sanders MJ et al. (2012) Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal *Enterobacteriaceae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 1269–1274.
11. Brabban AD, Hite E, Callaway TR (2005) Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer. *Foodborne Pathog Dis* 2: 287-303.
12. Chopra I, Roberts M (2001) Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 232-260.
13. Sunde M, Norstrom M (2006) The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *J Antimicrob Chemother* 58: 741–7.

14. Smith DeWaal C, Vaughn Grooters S (2013) Antibiotic resistance in foodborne pathogens. Washington, DC: Center for Science in the Public Interest. pp. 1-22.
15. Lavilla Lerma L, Benomar N, Gálvez A, Abriouel H (2013) Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *Int J Food Microbiol* 161: 97–106.
16. De los Reyes-Gavilan CG, Limsowtin GKY, Tailliez P, Séchaud L, Acholas JP (1992) A *Lactobacillus helveticus*-specific DNA probe detects restriction fragment length polymorphisms in this species. *Appl Environ Microbiol* 58: 3429–3432.
17. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press. Cold Spring Harbor.
18. Smith MS, Yang RK, Knapp CW, Niu Y, Peak N et al. (2004) Quantification of Tetracycline Resistance Genes in Feedlot Lagoons by Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol* 70: 7372-7377.
19. Naser SM, Thompson FL, Hoste B, Gevers D, Dawyndt P et al. (2005) Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiol* 151: 2141-2150.
20. Dancey C, Reidy J (2004). *Statistics without Maths for Psychology: using SPSS for Windows*. London: Prentice Hall.
21. Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon P (2008) Resistance in bacteria of the food chain: Epidemiology and control strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther* 6: 733–750.
22. Guardabassi L, Stegger M, Skov R (2007) Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 in Danish slaughter pigs. *Vet Microbiol* 122: 384-386.
23. Van den Bogaard A, London N, Driessen C, Stobberingh E (2001) Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemoth* 47: 763–71.
24. Gregova G, Kmetova M, Kmet V, Venglovsky J, Feher A (2012) Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from a poultry slaughterhouse. *Ann Agric Environ Med* 19: 75-77.
25. Brtkova A, Bujdakova H (2009) Antibiotic resistance in *Enterococcus* isolates from poultry swabs in Slovakia. *J Food Nutr Res* 48: 121-128.
26. Aradhye AA, Kolhe RP, Bhong CD, Deshpande PD, Lokhande SD et al. (2014) Prevalence of antimicrobial resistant pathotypes of *Escherichia coli* in beef cattle and slaughterhouse premise. *Afr J Microbiol Res.* 8: 277-286.

- 397 **27.** Gow SP, Walder CL, Harel J, Boerlin P (2008) Associations between antimicrobial  
398 resistance genes in fecal generic *Escherichia coli* isolates from cow-calf herds in  
399 western Canada. *Appl Environ Microbiol* 74: 3658-3666.
- 400 **28.** Skočková A, Cupáková S, Karpíšková R, Janštová B (2012) Detection of  
401 tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* from raw cow's milk. *J Microbiol*  
402 *Biotech Food Sci* 1: 777-784.
- 403 **29.** Roberts MC (2005) Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS*  
404 *Microbiol Lett* 245: 195-203.
- 405 **30.** Hammerum AM, Sandvang D, Andersen SR, Seyfarth AM, Porsbo LJ et al. (2006)  
406 Detection of sul1, sul2 and sul3 in sulphonamide resistant *Escherichia coli* isolates  
407 obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. *Int J Food Microbiol* 106:  
408 235–237.
- 409 **31.** Trobos M, Jakobsen L, Olsen KE, Frimodt-Moller N, Hammerum AM et al. (2008)  
410 Prevalence of sulphonamide resistance and class 1 integron genes in *Escherichia coli*  
411 isolates obtained from broilers, broiler meat, healthy humans and urinary infections  
412 in Denmark. *Int J Antimicrob Agents* 32: 367–369.
- 413 **32.** Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L (2005) Dissemination of sulfonamide  
414 resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and  
415 relation with integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 836–839.
- 416 **33.** Bean DC, Livermore DM, Hall LM (2009) Plasmids imparting sulfonamide  
417 resistance in *Escherichia coli*: implications for persistence. *Antimicrob Agents*  
418 *Chemother* 53: 1088–1093.
- 419 **34.** Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J et al. (2008) Dissemination of  
420 clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase  
421 CTX-M-15. *Emerg. Infect. Dis.* 14:195–200.
- 422 **35.** Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright GD (2010) The tetracycline resistome.  
423 *Cell Mol Life Sci* 67: 419-431.
- 424 **36.** Auerbach EA, Seyfried EE, McMahon KD (2007) Tetracycline resistance genes in  
425 activated sludge wastewater treatment plants. *Water Res* 41:1 143-1151.
- 426 **37.** Pei R, Kim SC, Carlson KH, Pruden A (2006) Effect of river landscape on the  
427 sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes  
428 (ARG). *Water Res* 40: 2427-2435.

- 429 **38.** Knapp CW, Dolfig J, Ehler PAI, Graham DW (2010) Evidence of increasing  
430 antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ Sci*  
431 *Technol* 44: 580-587.
- 432 **39.** Zhang XX, Zhang T (2011) Occurrence, abundance, and diversity of tetracycline  
433 resistance genes in 15 sewage treatment plants across China and other global  
434 locations. *Environ Sci Technol* 45: 2598-2604.
- 435 **40.** Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX et al. (2013) Diverse and abundant  
436 antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:  
437 3435–3440.
- 438 **41.** Florez AB, Ammor MS, Mayo B (2008) Identification of *tet(M)* in two *Lactococcus*  
439 *lactis* strains isolated from a Spanish traditional starter-free cheese made of raw milk  
440 and conjugative transfer of tetracycline resistance to lactococci and enterococci. *Int J*  
441 *Food Microbiol* 121: 189-194.
- 442 **42.** Molbak K, Baggesen DL, Aarestrup FM, Ebbesen JM, Engberg J et al. (1999) An  
443 outbreak of multidrug-resistant, quinolone- resistant *Salmonella enterica* serotype  
444 Typhimurium DT104. *N Engl J Med* 341: 1420–1425.
- 445 **43.** Ng LK, Martin I, Alfo M, Mulvey M (2001) Multiplex PCR for the detection of  
446 tetracycline resistance genes. *Mol Cell Probes* 15: 209–215.
- 447 **44.** Birkett CI, Ludlam HA, Woodford N, Brown DF, Brown NM et al. (2007) Real-  
448 time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M  
449 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Med Microbiol* 56: 52–55.

**Figure legends**

**Figure 1.** Detection of different antibiotic resistance genes (tetracycline, sulfonamide and beta-lactam genes) in different slaughterhouse zones and meat products.

**Figure 2.** Relative concentrations of tetracycline resistance genes (A, *tetA*; B, *tetB*; C, *tetO*; D, *tetQ*) in different slaughterhouse zones and meat products.

**Figure 3.** Relative concentrations of sulfonamide resistance genes (A, *sulI*; B, *sulII*; C, *sulIII*) in different slaughterhouse zones and meat products.

**Figure 4.** Relative concentrations of beta-lactam resistance genes (A, *bla<sub>CTX</sub>*; B, *bla<sub>TEM</sub>*) in different slaughterhouse zones and meat products.

**Figure 5.** Gene abundance (absolute values per ml) of all antibiotic resistance genes (A, tetracyclines genes; B, sulfonamide genes; and C, beta-lactam genes) in different slaughterhouse zones and meat products.

**Figure 6.** Percentage of tetracycline, sulfonamide and beta-lactam total resistances.

**Table 1.** Primers and conditions used in this study.

Target	Primer	Sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Reference
<i>pheS</i>	pheS 21-F pheS 23-R	CAYCCNGCHCGYGAYATGC GGRTGRACCATVCCNGCHCC	46	[19]
<i>tet(A)</i>	TetA-F TetA-R	GCTACATCCTGCTTGCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG	55	[43]
<i>tet(B)</i>	TetB-F TetB-R	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG GTAATGGGCCAATAACACCG	55	[43]
<i>tet(O)</i>	TetO-F TetO-R	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC TCCCACTGTTCCATATCGTCA	55	[43]
<i>tet(Q)</i>	TetQ-F TetQ-R	TTATACTTCCTCCGGCATCG ATCGGTTCGAGAATGTCCAC	55	[43]
<i>sulI</i>	SulI- F SulI- R	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG	65	[37]
<i>sul II</i>	SulII- F SulII- R	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG	57.5	[37]
<i>sul III</i>	SulIII- F SulIII- R	TCCG TTCAGCGAATTGGTGCAG TTCG TTCACGCCTTACACCAGC	61	[37]
<i>bla<sub>CTX</sub></i>	CTX-consensus primer F CTX consensus primer R	GCAGYACCAGTA ARGTKATGGC ATCACKCGGRTCGCCXGGRAT	58	Modified from [44]
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	BlaTEM- F BlaTEM- R	TCGGGGAAATGTGCG GGAATAAGGGCGACA	50	[38]

**Table 2.** Quantification of ARGs in different slaughterhouse zones and end products.

Gene	Zone	Mean $\pm$ Stat Signif Diff*	Gene	Zone	Mean $\pm$ Stat Signif Diff*
<i>tetA</i>	F3	-2.219 $\pm$ 0.019 A	<i>sulII</i>	F2	-1.875 $\pm$ 0.007 A
	MP	-1.870 $\pm$ 1.091 A		F3	-1.730 $\pm$ 0.004 A
	E	-1.550 $\pm$ 0.029 A		SR	-1.662 $\pm$ 1.473 A
	WR	-1.514 $\pm$ 0.012 A		F1	-1.641 $\pm$ 0.049 A
	SR	-1.334 $\pm$ 1.000 A		F4	-1.600 $\pm$ 0.845 A
	CR	-1.260 $\pm$ 0.831 A		E	-1.430 $\pm$ 0.055 A
	F2	-0.743 $\pm$ 0.033 A		CR	-1.165 $\pm$ 0.651 A
<i>tetB</i>	F1	-1.797 $\pm$ 0.040 A	<i>sulIII</i>	WR	-0.024 $\pm$ 0.002 A
	MP	-1.750 $\pm$ 0.040 A		F1	-1.270 $\pm$ 0.055 A
	FrT	-0.975 $\pm$ 0.032 AB		CR	-1.081 $\pm$ 1.112 A
	F3	-0.450 $\pm$ 0.523 BC		MP	-0.946 $\pm$ 0.181 A
	CR	-0.389 $\pm$ 0.297 BC		WR	-0.786 $\pm$ 0.680 A
	SR	-0.184 $\pm$ 0.318 BC		F3	-0.764 $\pm$ 0.048 A
	WR	-0.090 $\pm$ 0.019 C		SR	-0.500 $\pm$ 0.932 A
	F2	-0.083 $\pm$ 0.005 C		F2	-0.380 $\pm$ 0.026 A
<i>tetO</i>	F4	-0.034 $\pm$ 0.042 C		F4	-0.253 $\pm$ 0.162 A
	FrT	-0.428 $\pm$ 0.017 A	<i>sulIII</i>	E	-3.629 $\pm$ 0.060 A
	MP	-0.330 $\pm$ 0.361 A		CR	-2.910 $\pm$ 0.839 A
	WR	-0.184 $\pm$ 0.014 A		MP	-2.613 $\pm$ 0.657 A
	F3	-0.123 $\pm$ 0.036 A		F4	-2.425 $\pm$ 0.732 A
	CR	-0.060 $\pm$ 0.139 A		F3	-2.386 $\pm$ 0.555 A
<i>tetQ</i>				F1	-2.318 $\pm$ 0.044 A
				SR	-2.104 $\pm$ 0.910 A
				WE	-1.437 $\pm$ 1.752 A
			<i>bla<sub>CTX</sub></i>	CR	-5.276 $\pm$ 0.374 A
	F4	-3.713 $\pm$ 2.039 A		FrT	-5.218 $\pm$ 0.025 A
	SR	-2.397 $\pm$ 2.284 A		WR	-4.467 $\pm$ 0.472 AB
	WR	-1.709 $\pm$ 1.632 A		SR	-4.342 $\pm$ 0.574 AB
	F3	-1.129 $\pm$ 0.178 A		F4	-3.459 $\pm$ 0.765 B
	E	-0.152 $\pm$ 0.033 A	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	F3	-3.652 $\pm$ 1.087 A
	MP	-0.128 $\pm$ 0.019 A		MP	-2.512 $\pm$ 0.055 AB
	F2	0.008 $\pm$ 0.030 A		F1	-2.490 $\pm$ 1.675 AB
	FrT	0.004 $\pm$ 0.002 A		CR	-2.095 $\pm$ 0.547 AB
				SR	-2.036 $\pm$ 1.275 AB
				F4	-1.873 $\pm$ 0.038 AB
				WR	-0.257 $\pm$ 0.022 B

\*Different letters represent significant differences according to Tukey or Games-Howell tests ( $p < 0.05$ ).



**Table 3.** Correlations between the relative concentrations of ARGs in different slaughterhouse zones (per *pheS* gene; *log*-transformed).

<b>Zone</b>	<b>Entrance</b>	<b>Slaughtering Room</b>	<b>Fridge 1</b>	<b>Cutting Room</b>	<b>Fridge 2</b>	<b>Fridge 3</b>	<b>Freezing Tunnel</b>	<b>Fridge 4</b>	<b>White R</b>	<b>Meat Products</b>
<b>Entrance</b>	1									
<b>Slaughtering Room</b>	0.052	1								
<b>Fridge1</b>	0.427	0.672 <sup>*</sup>	1							
<b>Cutting Room</b>	-0.234	0.735 <sup>**</sup>	0.480	1						
<b>Fridge2</b>	0.348	0.213	0.712 <sup>*</sup>	0.795 <sup>*</sup>	1					
<b>Fridge3</b>	0.082	0.029	-0.691 <sup>*</sup>	0.056	-0.268	1				
<b>Freezing Tunnel</b>	0.332	0.025	0.296	0.180	0.190	0.310	1			
<b>Fridge 4</b>	0.150	-0.114	-0.201	-0.060	0.374	0.301	0.405	1		
<b>White Room</b>	0.118	0.647 <sup>**</sup>	0.084	0.609 <sup>**</sup>	0.078	0.493	0.223	0.050	1	
<b>Meat Products</b>	-0.069	0.132	-0.337	0.289	-0.288	-0.008	0.423	0.608 <sup>**</sup>	-0.064	1

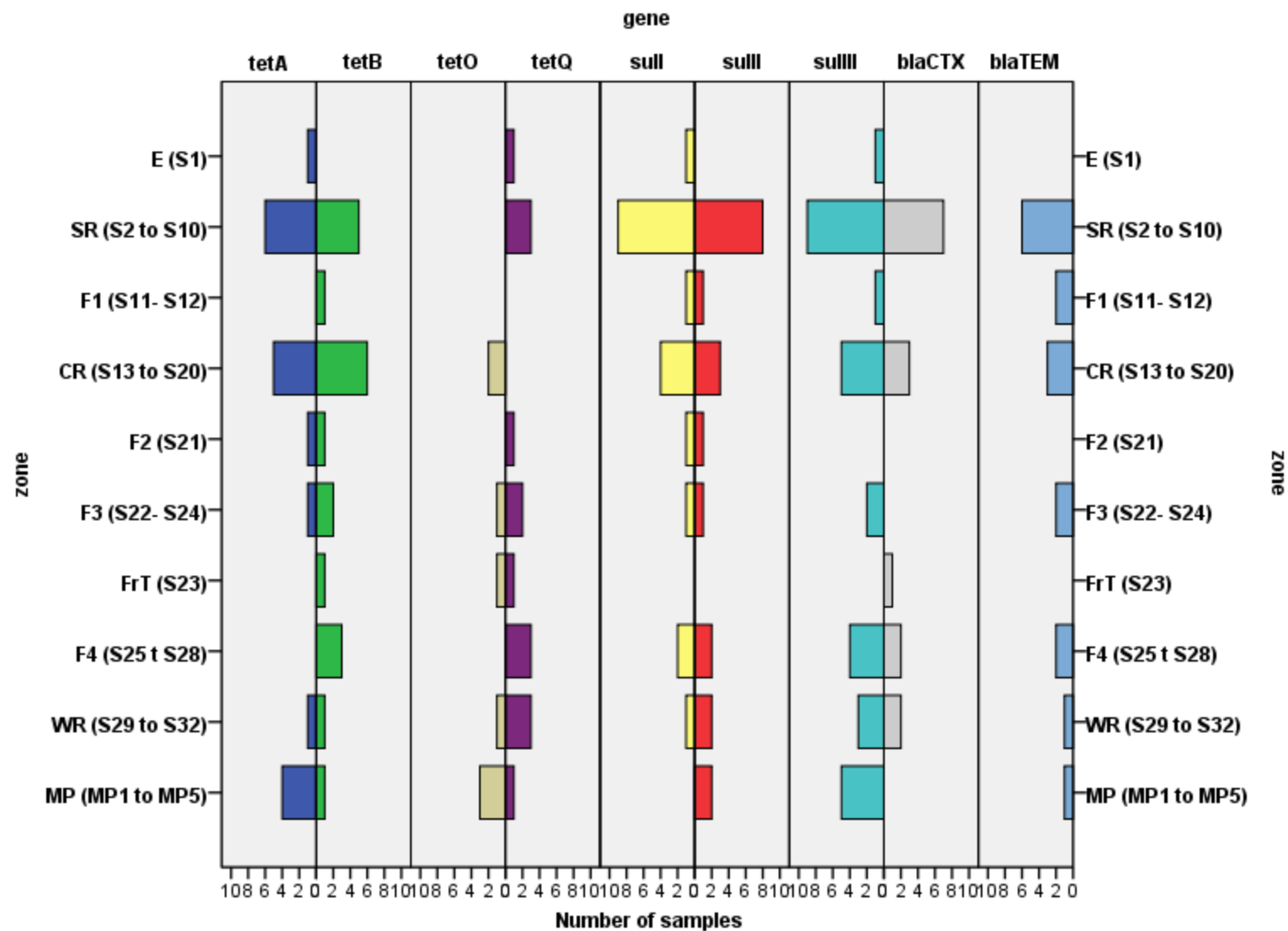
\* Asterisk denoted significant correlation at  $p < 0.05$  level (2- tailed).

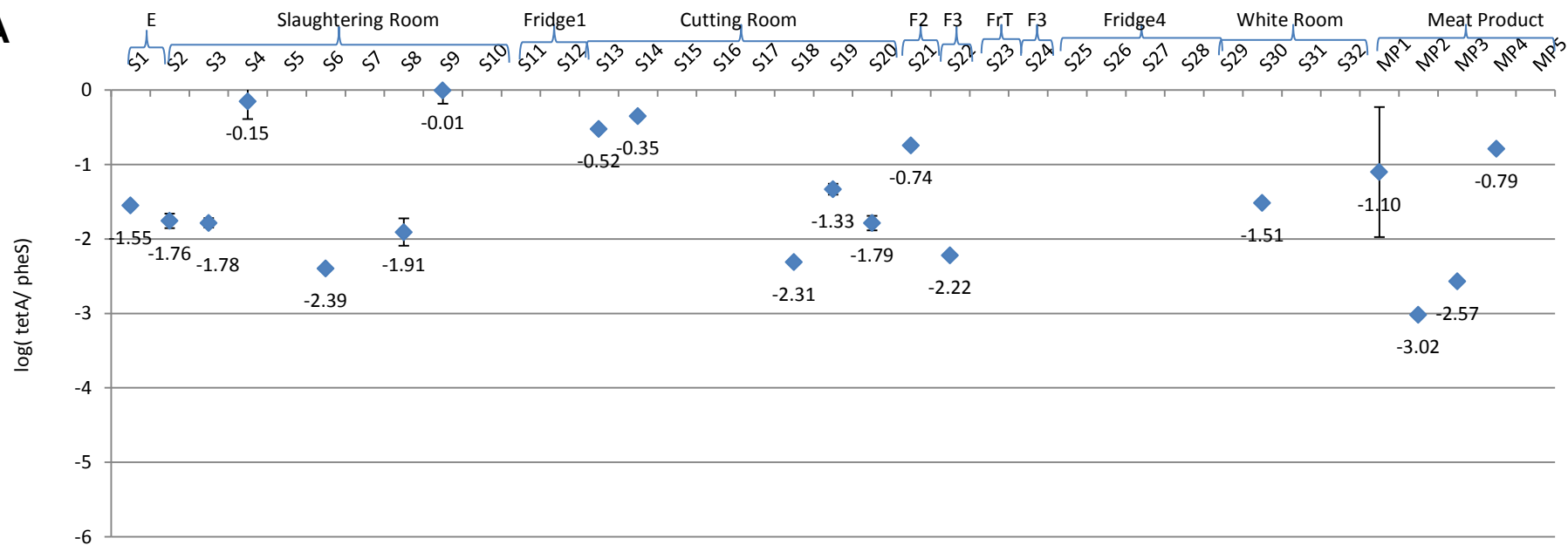
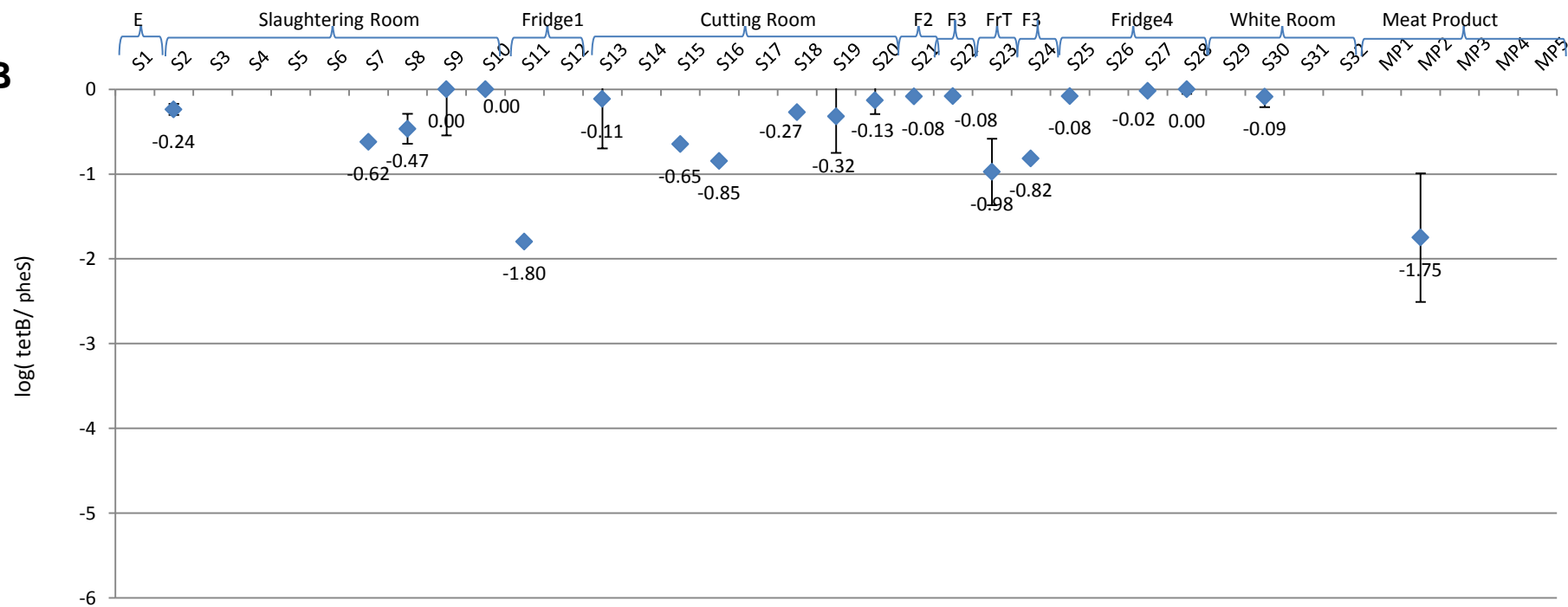
\*\*Double asterisk denoted significant correlation at  $p < 0.01$  level (2- tailed)

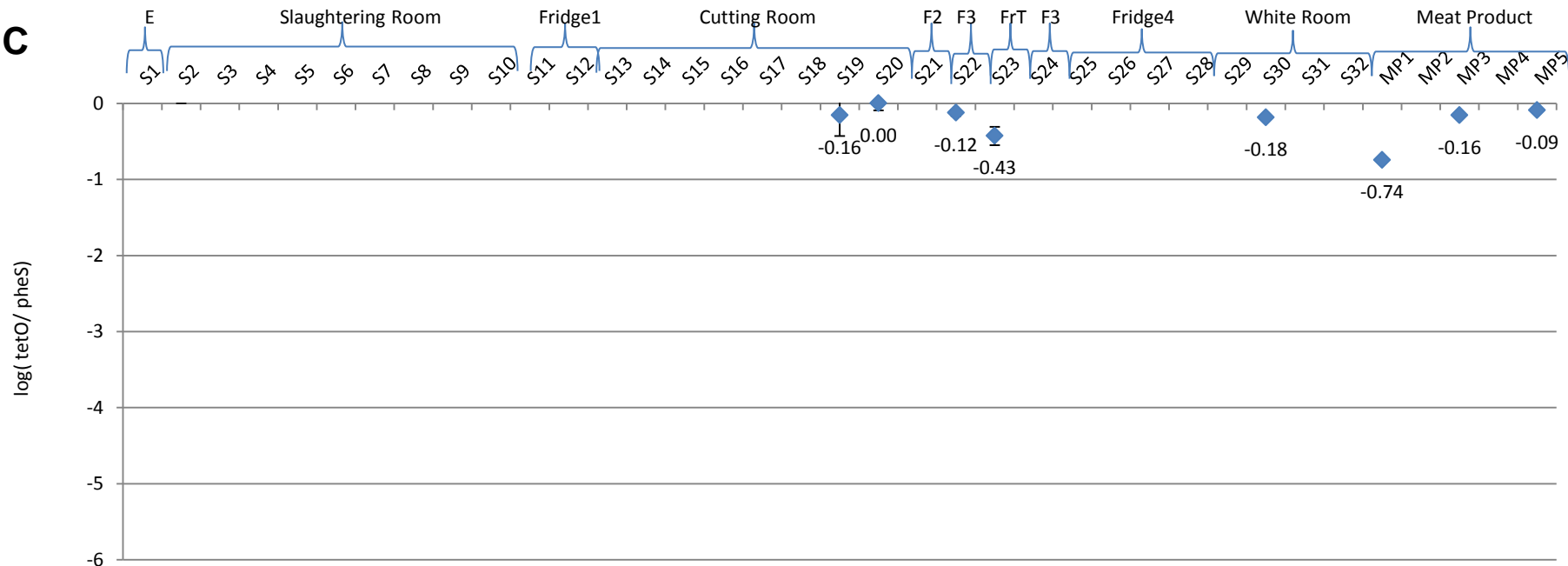
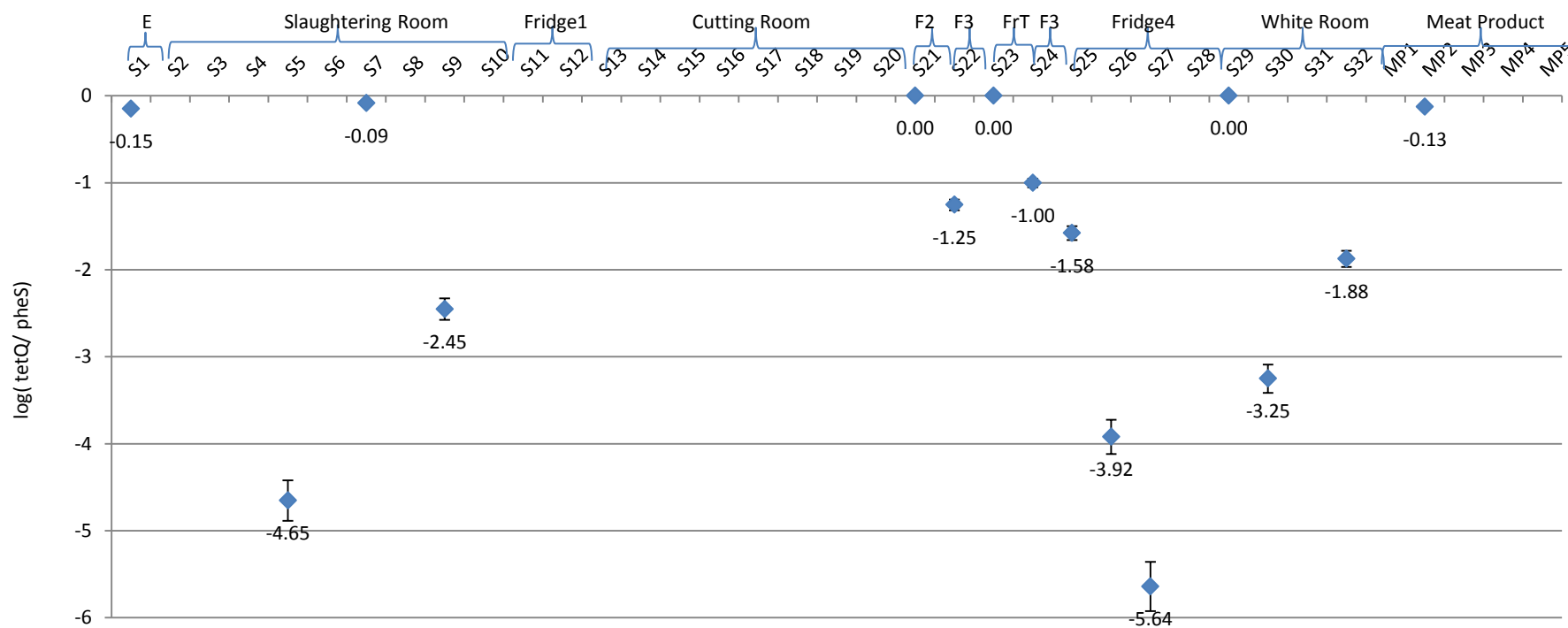
**Table 4.** Correlations between relative concentrations of different ARGs (per *pheS* gene; *log*-transformed).

Gene	<i>bla<sub>CTX</sub></i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>tetO</i>	<i>tetQ</i>	<i>sull</i>	<i>sulll</i>	<i>sullll</i>
<i>bLa<sub>CTX</sub></i>	1								
<i>bLA<sub>Tem</sub></i>	-0.318	1							
<i>tetA</i>	0.212	-0.514*	1						
<i>tetB</i>	0.138	-0.213	-0.024	1					
<i>tetO</i>	-0.220	-0.135	-0.237	0.148	1				
<i>tetQ</i>	-0.126	0.168	-0.385	-0.007	0.641*	1			
<i>sull</i>	-0.152	-0.373	0.039	0.187	0.513	0.535*	1		
<i>sulll</i>	-0.224	0.134	-0.128	0.348	-0.025	0.295	0.336	1	
<i>sullll</i>	-0.380	-0.316	0.012	-0.010	0.245	-0.054	0.234	0.065	1

\*Asteristik denoted significant correlation at  $p < 0.05$  level (2- tailed).

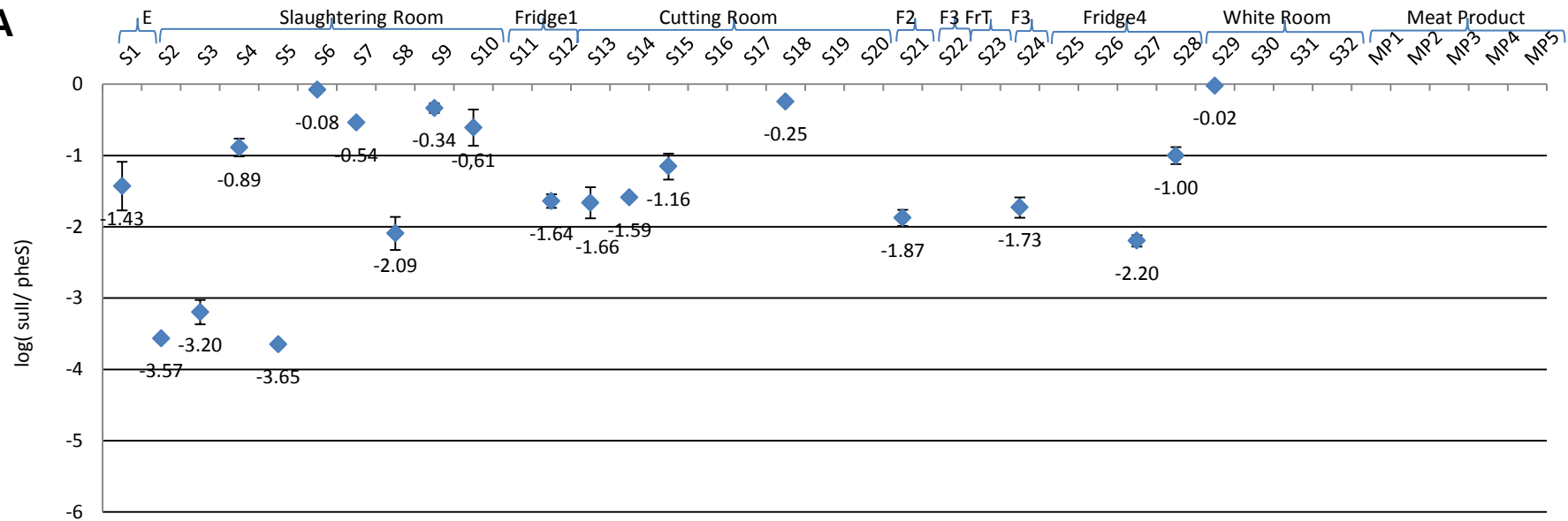
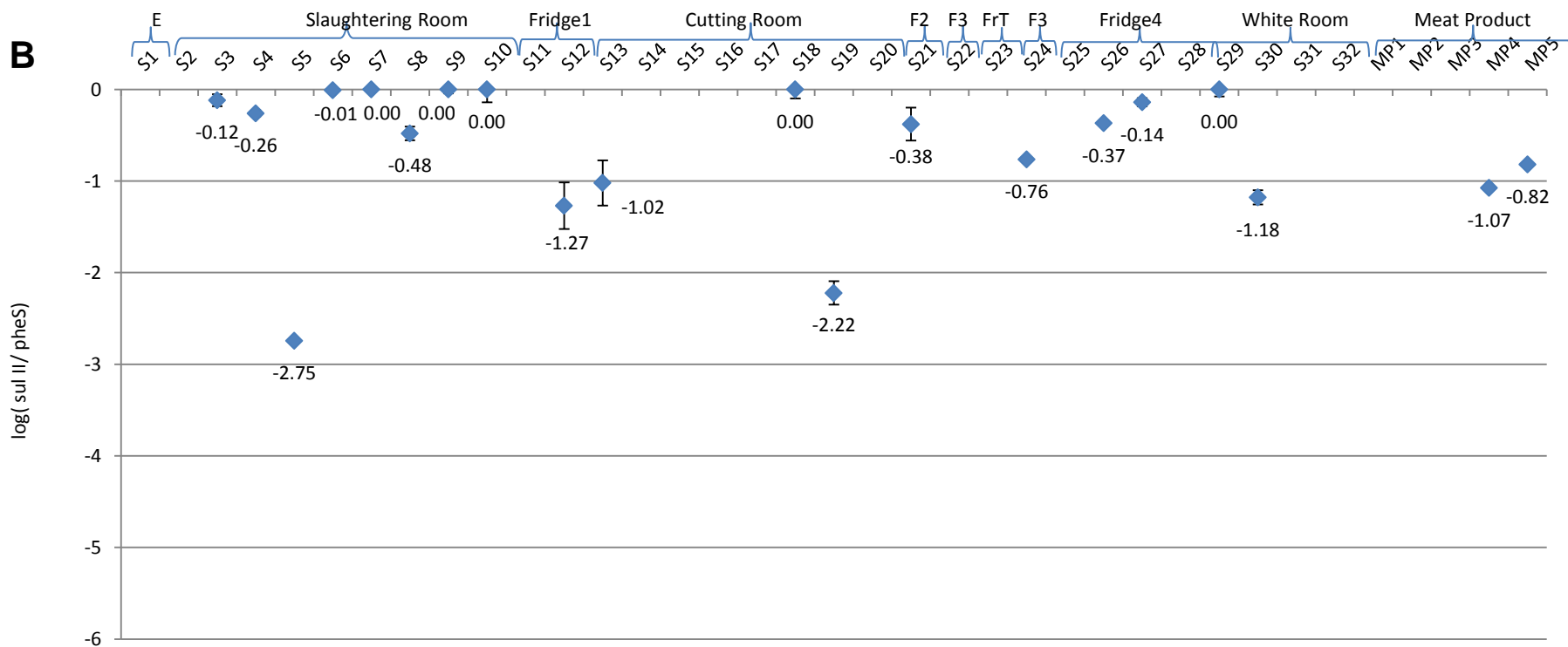


**A****B**

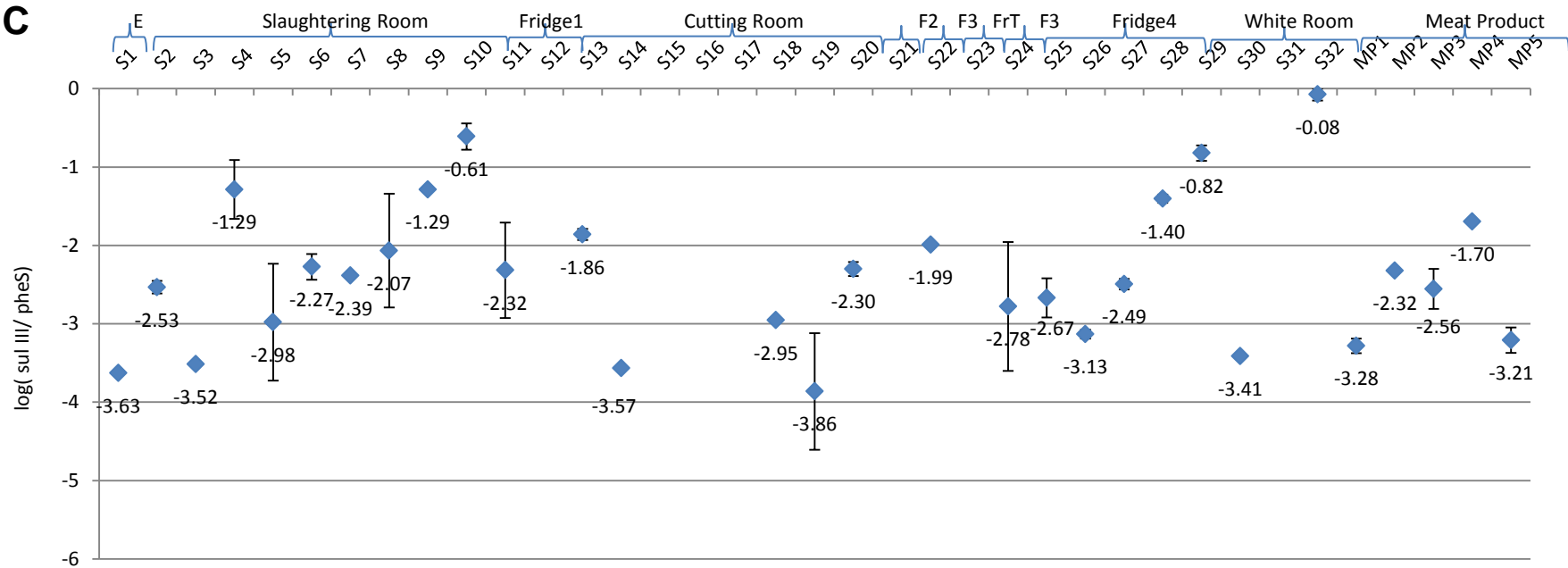
**C****D**

Lavilla Lerma et al.

Figure 2

**A****B**

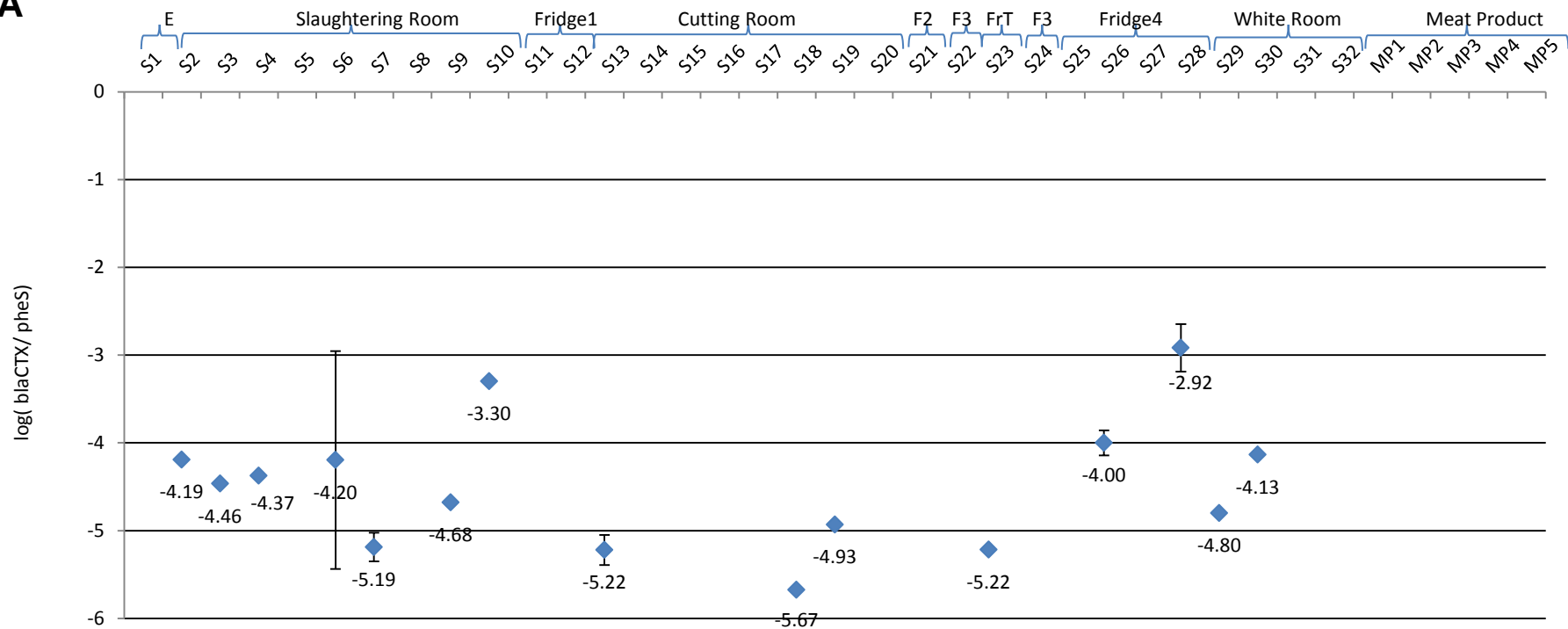
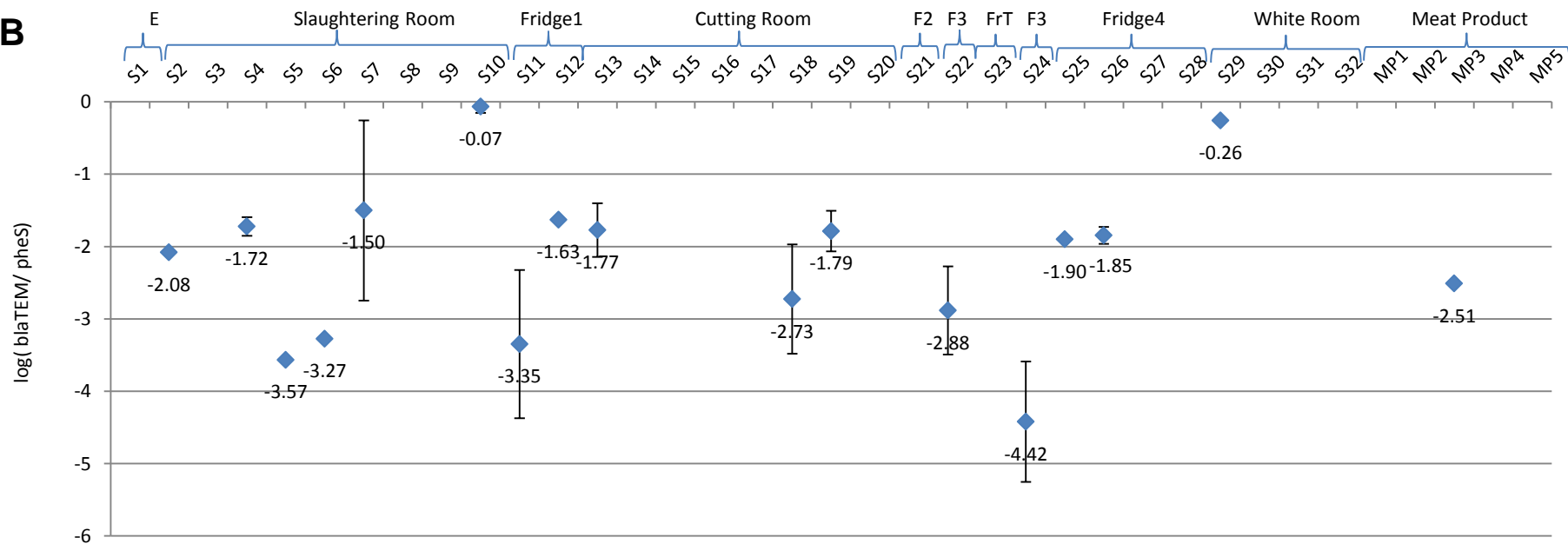
C



Lavilla Lerma et al.

Figure 3

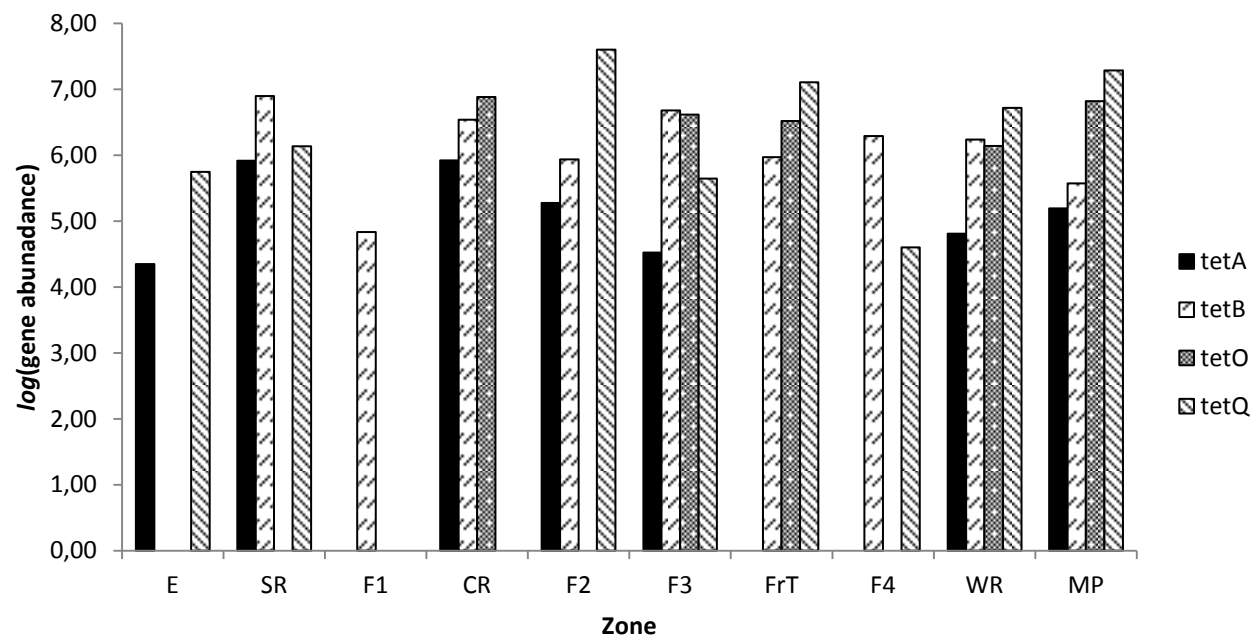


**A****B**

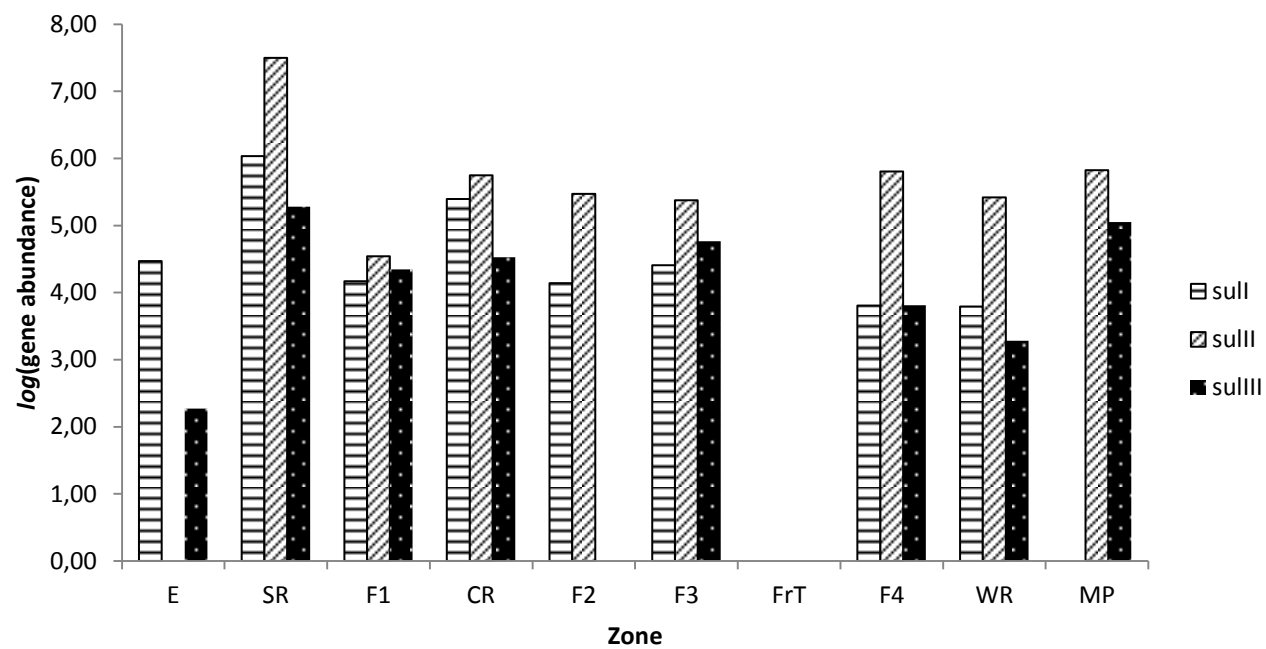
Lavilla Lerma et al.

Figure 4

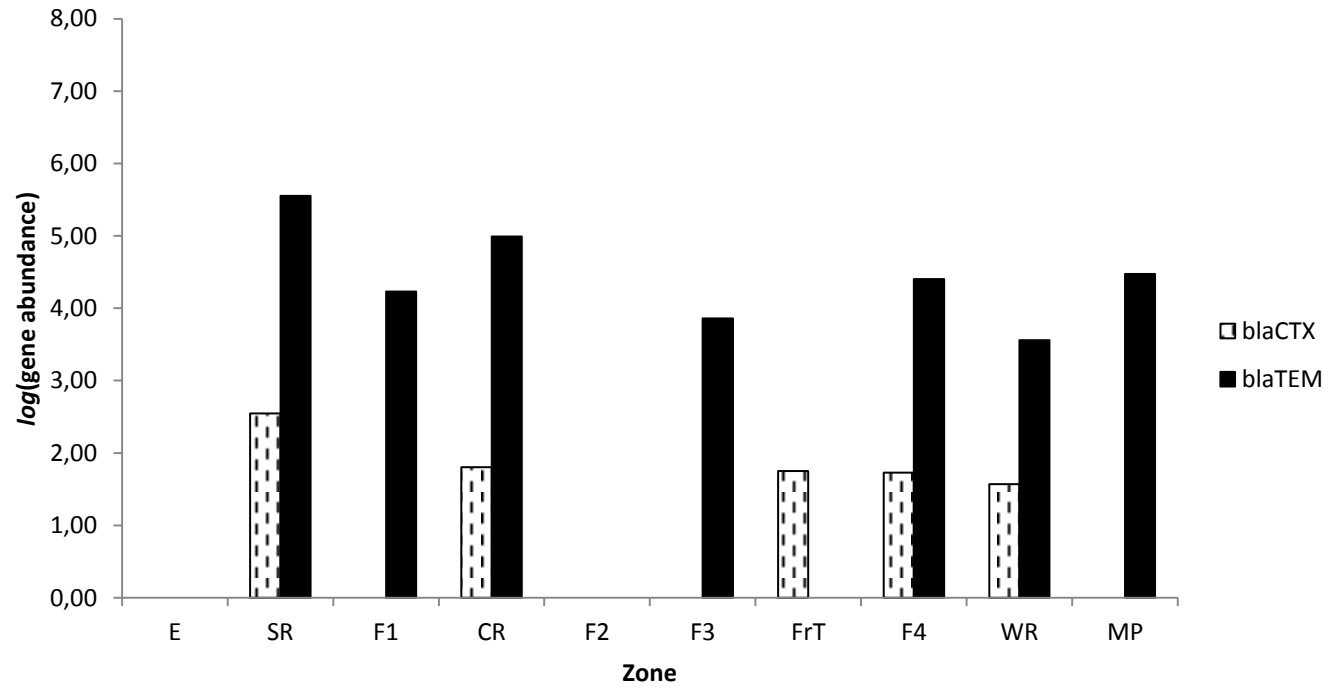
**A**

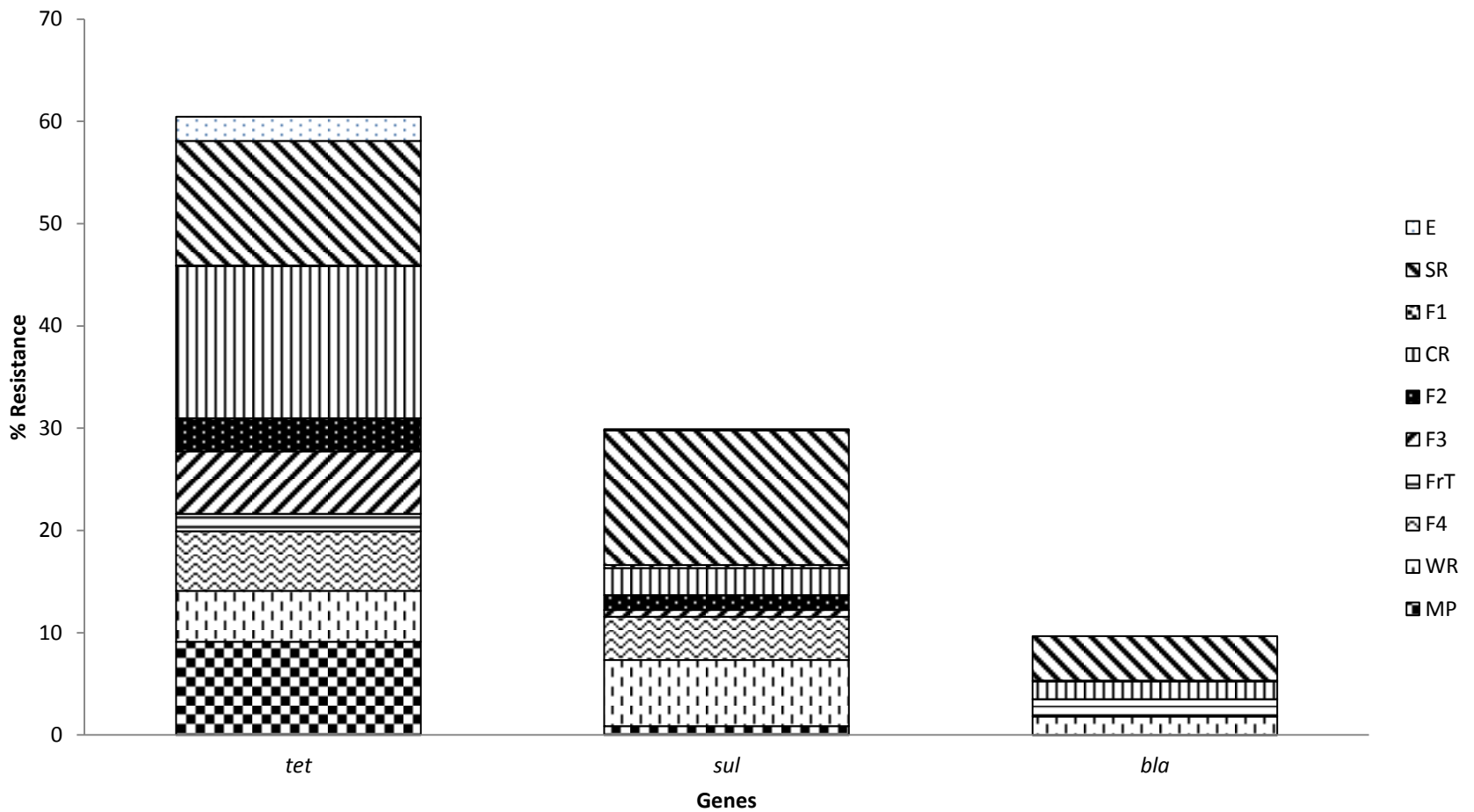


**B**



**C**





## Capítulo II

**Incidencia de resistencias a antibióticos y/o biocidas en Pseudomonads aisladas de la cadena de producción de la carne.**

## APORTACIÓN 1

**Leyre Lavilla Lerma, Nabil Benomar, María del Carmen Casado Muñoz, Antonio Gálvez, Hikmate Abriouel. 2014. Antibiotic Multiresistance Analysis of Mesophilic and Psychrotrophic *Pseudomonas* spp. Isolated from Goat and Lamb Slaughterhouse Surfaces throughout the Meat Production Process. Applied and Environmental Microbiology 80 (21). En prensa.**



1 Antibiotic multi-resistance analysis of mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* sp.  
2 isolated from goat and lamb slaughterhouse surfaces throughout meat chain production

3  
4  
5 Leyre Lavilla Lerma, Nabil Benomar, María del Carmen Casado Muñoz, Antonio  
6 Gálvez, and Hikmate Abriouel\*

7  
8  
9 *Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias*  
10 *Experimentales, Universidad de Jaén, 23071-Jaén, Spain.*

11  
12 Running Title: Multi-drug resistance of *Pseudomonas* sp.

13  
14  
15 Address correspondence to Hikmate Abriouel, hikmate@ujaen.es

16 \*Present address: Área de Microbiología. Departamento de Ciencias de la Salud.  
17 Facultad de Ciencias Experimentales. Edif. B3. Universidad de Jaén. Campus Las  
18 Lagunillas s/n. 23071-Jaén, Spain. Tel.: 34-953-212003; fax: 34-953-212943.

19

**Abstract**

The aim of this study was to investigate the phenotypic and genotypic antibiotic resistance profiles of pseudomonads isolated from surfaces of a goat and lamb slaughterhouse representative of the region as a possible source of meat contamination. Mesophilic (85 isolates) and psychrotrophic (37 isolates) pseudomonads identified at species level were generally resistant to sulfamethoxazole, erythromycin, amoxicillin, ampicillin, chloramphenicol, trimethoprim, rifampicin and ceftazidime (especially mesophiles), and colistin and tetracycline (especially psychrotrophes). However, they were generally sensitive to ciprofloxacin, gentamicin, imipenem and kanamycin regardless the species identity. Worryingly, in the present study we found multidrug resistance (MDR) up to 13 antibiotics which was related with intrinsic and acquired resistance mechanisms. Furthermore, linkage between various antimicrobial resistance genes was shown for beta-lactams and tetracycline, trimethoprim or sulfonamides. The distribution and resistome-based analysis of MDR pseudomonads in different slaughterhouse zones indicated that the main sources of the identical or related pseudomonad strains were the animals (feet and wool) and the slaughterhouse environment, being disseminated from the beginning “Entrance” to the end of the meat processing production “Meat products”. Those facts must be taken into consideration to avoid cross-contamination with subsequent flow of mobile resistance determinants throughout all slaughterhouse zones and then to human and the environment by the application of adequate practices of hygiene and disinfection measures including animal wool and feet and also the entrance environment.

## INTRODUCTION

The genus *Pseudomonas* belongs to the bacterial family *Pseudomonadaceae*, class of the *Gammaproteobacteria* and is considered the most heterogeneous group of Gram-negative bacteria that includes aerobic rods, motile, catalase positive and non-spore-forming bacteria (1). Their oxygen requirement could be changed under anaerobic conditions by using an alternative electron acceptor such as nitrate. Those bacteria are ubiquitous because of their simple nutritional requirements and their high metabolic versatility being isolated from a variety of sources like soil, fresh water, humans, plant and animal surfaces, cosmetics, medical products and instruments, and also foods of animal and vegetal origins. Thus, *Pseudomonas* sp. belongs to a group of organisms of great ecological importance as opportunistic pathogens causing a variety of infectious diseases in animals and humans since they are part of the normal bacterial flora of the pharynx, mucous membranes and skin of humans (2). They also play role as phytopathogens (3, 4) and as spoilage organisms. In this sense, pseudomonads may cause off-flavour (5-7) especially in proteinaceous foods with high water activity like meat and fresh cheese, browning of minimally processed vegetables because of their pectinolytic activity (8-9), off-flavour in fish products due to the production of volatile compounds and degradation of amino acids (10-13) and also lipolysis and proteolysis of processed milk due to production of thermo-tolerant enzymes (6, 14). Furthermore, they are of great concern in chilled food spoilage because of their psychrotrophic condition especially *P. fragi*, *P. putida* and *P. fluorescens* (15) which causes bitterness, putrefaction and rancid odour, liquefaction, gelatinization of curd, and slime and mucous formation on cheese surfaces.

Pseudomonads as spoilage or as pathogenic bacteria could inhabit vastly different ecological niches where the key factors driving to the emergence of resistance may be present (antibiotics and antibiotic resistance “AR” genes) (16). Spread of multiple drug resistant (MDR) pseudomonads from different sources to humans and also to the environment imply frequently spread of resistance genes by horizontal gene transfer, since many of them are located on plasmids, integrons or transposons (17). The evolution and dissemination of AR genes among pseudomonads and among environments globally which were enhanced by their genetic flexibility and versatility is an increasing problem in infectious diseases. In this way, gene transfer crosses species

79 and genus barriers (18), thus genes flow to and from Gram-positive and Gram-negative  
80 bacteria in different environments.

81 The prevalence of MDR pseudomonads and enterobacteria in slaughterhouses has  
82 been largely reported in several studies including swine and poultry environments (19-  
83 22), creating a growing concern about their impact on animal and human health. At the  
84 slaughter and processing plant, and farm it is difficult to reduce risks related with  
85 pathogens normally present in gut of healthy animals and also meat, so microorganisms  
86 present in animal foods and their processing environment may cause a great challenge  
87 for human health in terms of their pathogenic power and their role as potential reservoir  
88 of AR genes (20, 23, 24). Indeed, it is interesting to highlight that commensal bacteria -  
89 considered as free of health risk- could also be vehicles of AR genes although food-  
90 borne pathogens are the main reservoirs (25, 26). The principal factor linked to the  
91 emergence of microbial resistance is the extensive use or rather misuse of antibiotics in  
92 different areas such as bacterial infection treatment, animal husbandry and agriculture  
93 (27-32) which may generate an enormous worldwide selective pressure (16, 33).

94 In the present study, we report for the first time the prevalence of multiple antibiotic  
95 resistant pseudomonads in a goat and lamb slaughterhouse. This study involved the  
96 analysis of phenotypic and genotypic antibiotic resistance profile of 122 mesophilic and  
97 psychrotrophic pseudomonads isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat  
98 chain production and also from the end products. Mesophilic (growth at 30°C for 72 h)  
99 and psychrotrophic (growth at 7°C for 10 days) pseudomonads were isolated as  
100 described by Lavilla Lerma et al. (34) in King agar and Tryptone Soya Agar,  
101 respectively. Furthermore, we evaluated the relationship between environmental  
102 pseudomonads and the end products with the aim to elucidate if they share an antibiotic  
103 resistome.

104

105

## MATERIAL AND METHODS

**Bacterial strains and culture conditions.** 37 psychrotrophic and 85 mesophilic isolates of antibiotic-resistant pseudomonads were used in the present study. The strains were obtained from different surfaces (entrance, killing-room, cold-room, cutting-room, freezing-tunnel and white-room) of a local goat and lamb slaughterhouse in Jaén (Spain) and also from five meat products from different shops in Jaén as described previously by Lavilla Lerma et al. (34). All strains were maintained and stored in tryptone-soya-broth (TSB; Scharlab, Barcelona, Spain) containing 20% glycerol at – 80°C. For routine use, mesophilic and psychrotrophic pseudomonads were cultivated on TSB at 22°C for 24-48 h.

**Antimicrobial agents.** The antimicrobial agents used in this study included various antibiotics used in clinical area such as penicilins (Amoxicillin “AMX” and Ampicillin “AMP”), cephalosporin (Ceftazidime “CAZ”), fluoroquinolone (Ciprofloxacin “CIP”), miscellaneous (Chloramphenicol, “CHL”, Rifampicin “RIF”, Sulfametoxazol “SMZ” and Trimethoprim “TMP”), macrolide (Erythromycin “ERY”), aminoglycosides (Gentamicin “GEN”, Kanamycin “KAN”, Streptomycin “STR”), carbapenem (Imipenem “IPM”), lipopeptides (Colistin “CL” and Polymixin B “PB”) and Tetracycline “TET”. Stock solutions of all antibiotics used in the present study (Tables 1 and 2) were prepared and diluted according to guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (35).

### Molecular identification of pseudomonads

**DNA extraction.** Total DNA was extracted from cultures by the method described by De los Reyes-Gavilan et al. (36). This DNA preparation was used in further PCR reactions.

**ERIC-PCR fingerprinting of *Pseudomonas* strains.** Eric-PCR fingerprinting of *Pseudomonas* isolates was done as described by Martín-Platero et al. (37). DNA was amplified with primer ERIC1-R in 35 cycles (94 °C for 3 min; 35 cycles of 94 °C for 30s, 48°C for 60s and 72°C for 5 min; and 72°C for 7 min). Reactions were carried out in a total volume of 25 µl containing 2.5 µl of 10× *Taq* reaction buffer, 3 mM of MgCl<sub>2</sub>, 400µM of dNTPs, 1 µM of ERIC1-R primer (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'), 1 U of *Taq* DNA polymerase (GE-Healthcare) and 1µl of template DNA. Amplification products were separated by electrophoresis on 1.8% (w/v) agarose gel in 1 × TBE buffer (0.45 mM Tris-HCl, 0.45 mM boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.3) during 16 h at 46V. The gels were stained in ethidium bromide and photographed on a UV

transilluminator. Photo-positives were scanned into a computer and subsequently analyzed using the Bionumerics software version 2.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Grouping of the ERIC-PCR patterns was performed by means of the Pearson product moment correlation coefficient and the Unweighted Pair Group Method using arithmetic averages (UPGMA) cluster analysis.

**Identification of *Pseudomonas* sp. strains at species level.** Once the fingerprinting analysis was done, representative strains of each cluster were selected for their genetic identification by sequencing of *rpoD* and *gyrB* genes amplified by PCR using the primers described by Yamamoto et al. (38) and the nucleotide sequences were deposited in GenBank with the following accession numbers KM364994 to KM365013 and from KM370331 to KM370332. A search for homology of the DNA sequences was done using the BLAST algorithm available at the National Centre for Biotechnology Information (NCBI, USA).

To confirm the identity of strains, a multiplex species-specific PCR of the carbamoyl phosphate synthase gene small subunit (*carA*) was done as described by Ercolini et al. (39) to detect *P. lundensis*, and *P. putida*.

**Antimicrobial susceptibility testing.** The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the above mentioned antibiotics was measured in a concentration range from 2 to 4096 µg/ml for all antibiotics except for imipenem which ranged from 1 to 4096 µg/ml. After incubation, the MIC was read as the lowest concentration of each antimicrobial agent that inhibited the visible growth of the strain. All the MIC determinations of each antimicrobial for each strain were carried out in triplicate, and the reliable results were taken if at least two out of three replicates were in agreement. The microbiological breakpoints of most antibiotics tested were those defined by CLSI (40). Concerning beta-lactams (amoxicillin and ampicillin), kanamycin, streptomycin and trimethoprim, we used the microbiological breakpoint proposed by CLSI (40) for *Escherichia coli* since the official ECOFF (epidemiological cut-off) for *Pseudomonas* sp. has not been designated by the same international organization. The microbiological breakpoint of erythromycin and rifampicin were those proposed by Bruchmann et al. (41) and Tribuddharat and Fennewald (42), respectively.

**Molecular screening of resistance determinants.** PCR amplifications of well-known structural genes associated with resistance to beta-lactams (*bla<sub>OX4</sub>*, *bla<sub>CTX</sub>*, *bla<sub>SHV-1</sub>* and *bla<sub>TEM</sub>*), chloramphenicol (*catA1*, *catA2*, *catA3*, and *catB3*), macrolide (*ereA*, *ereB*, *ermA*, *ermB*, *msrA/B* and *mefA*), tetracycline (*tetA*, *tetB*, *tetO* and *tetQ*),

174 aminoglycosides [aad(E), *aphA-3*, *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia*, *aph(2')-Ib*, *aph(2')-Ic*, *aph(2')-*  
 175 *Id*, *aph(3')-IIIa* and *ant(4')-Ia*], trimethoprim (*dfrA* and *dfrD*) and sulfonamide (*sulI*,  
 176 *sulII* and *sulIII*) were performed following the methods described elsewhere (43-50) and  
 177 primers listed in Table S1 (see supplemental material). Efflux pumps mediating  
 178 multiple antibiotic resistances were also included in this study (Table S1) such as AcrA,  
 179 AcrB, TolC, MexAB, MexCD and MexXY (51, 52).

180 To investigate whether observed resistance to rifampicin was due to mutations in the  
 181 *rpoB* gene, PCR of the partial *rpoB* gene fragment (nt.1524–2159) was done as  
 182 described by Hosokawa et al. (53) using the primers listed in Table S1. The nucleotide  
 183 sequences were deposited in GenBank with the following accession numbers  
 184 KM370326 to KM370330.

185 **Analysis of integrons.** Class 1, 2 and 3 integrons were detected as described by  
 186 White et al. (54) and Ploy et al. (55) (Table S1).

187 **Statistical analysis.** Statistical analysis of data was accomplished using Excel 2007  
 188 and XLSTAT 2014 trial version (2014.1.03, Addinsoft, France) and the correlation  
 189 between all slaughterhouse variables (zones, antibiotics, population type) and  
 190 phenotypic resistance was determined by principal component analysis (PCA).

191 To identify the source of multiple antibiotic resistance, agglomerative hierarchical  
 192 cluster analysis was performed using XLSTAT 2014 trial version (2014.1.03,  
 193 Addinsoft, France) according to the Ward's method for clustering and the square  
 194 Euclidean distance as a measure of distance grouping to measure population similarities  
 195 between sampling zones in pseudomonad resistomes which was based on the incidence  
 196 of resistance determinants.

197

198

## RESULTS

### **Fingerprinting and identification of antibiotic-resistant mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* sp. isolated from slaughterhouse surfaces and meat products.**

A collection of 122 isolates of antibiotic-resistant pseudomonads (85 and 37 mesophilic and psychrotrophic isolates, respectively) isolated by Lavilla Lerma et al. (34) were reduced to 52 (38 mesophilic and 14 psychrotrophic strains) strains by ERIC-PCR analysis since isolates with identical ERIC-PCR patterns were considered the same strain (see Fig. S1 in the supplemental material). The genetic diversity of mesophilic pseudomonads was studied by ERIC-PCR and the dendrogram generated using Pearson correlation demonstrated the existence of one main cluster G1 (80% was used as the cutoff for defining the cluster) subdivided in two subclusters: subcluster G1A with 26 strains and G1B with 12 strains (see Fig. S1A in the supplemental material). Similarly, psychrotrophic pseudomonads showed one main cluster G1 (37 strains) subdivided in two subclusters: subcluster G1A and G1B with 11 and 3 strains, respectively (see Fig. S1B in the supplemental material). Identification of representative strains of each group in the dendrograms revealed that mesophilic pseudomonads were mainly represented by *P. lundensis* (82%), followed by a low proportion of *P. fluorescens* (8%), *P. alkylphenolia* and *P. putida* (5% each) (see Fig. S1A in the supplemental material). However, psychrotrophic pseudomonads were represented by 50% of *P. putida*, 29% of *P. fragi* and 21% of *P. lundensis* (see Fig. S1B in the supplemental material). Analysis of ERIC-PCR dendrograms displaying the distances between the 122 strains revealed that both mesophilic and psychrotrophic pseudomonads showed low degree of heterogeneity (similarity coefficient  $\approx$  80.4-82%).

On the other hand, analysis of ERIC-PCR dendrograms showed that strains isolated from the end products (the same clone) were also detected on surfaces throughout meat chain production that contaminate meat. Furthermore, isolates detected in entrance were the same as those detected in the end-products (ie. *P. lundensis* 1K04.1 and *P. lundensis* 1K13.1 from meat product were the same clones as *P. lundensis* M1K10.2 and *P. lundensis* M1K06.2 from entrance, respectively).

**Antibiotic susceptibility assays and MIC distributions.** MIC determination of the different antibiotics was performed with 52 pseudomonads identified at species level in the present study. The results obtained (Tables 1 and 2, Figs. 1 and 2) indicated that resistance to 16 antibiotics was detected in almost all pseudomonads tested depending



on the antibiotic used, the species analysed (*P. fragi*, *P. alkylphenolia*, *P. fluorescens*, *P. lundensis* and *P. putida*), the population type and the sampling zone.

#### Analysis of antibiotic resistance according to population type.

**Mesophilic pseudomonads.** Generally, mesophilic pseudomonads were resistant to sulfamethoxazol (100%); ampicillin, rifampicin and erythromycin (81-100%); amoxicillin, ceftazidime (except *P. alkylphenolia*), trimethoprim and chloramphenicol (50-100%), tetracycline (100% of *P. alkylphenolia*) regardless the species analysed (Table 1). However, sensitivity was shown to colistin (all *P. putida* and *P. alkylphenolia* strains); streptomycin and tetracycline (all *P. putida* and *P. fluorescens* strains); polymixin B (all sensitive except 48% of *P. lundensis*); imipenem (0-3% except *P. fluorescens* with 33%); ciprofloxacin, kanamycin and gentamicin (all sensitive except 6, 13 and 19%, respectively of *P. lundensis*).

**Psychrotrophic pseudomonads.** High resistance of psychrotrophic pseudomonads was shown to amoxicillin, ampicillin and erythromycin (100%); chloramphenicol and trimethoprim (71-100%). Nevertheless, higher sensitivity was obtained with ciprofloxacin (100% of all species); gentamicin and kanamycin (for all species except 14% of *P. putida*); imipenem (except *P. fragi*), and streptomycin and rifampicin (100% of *P. lundensis*). For the rest of antibiotics, intermediate resistance was shown for all species (Table 2).

Both sensitive mesophilic and psychrotrophic pseudomonads showed in most cases uni-modal MIC distributions in the low-intermediate range of concentration (Tables 1 and 2), while the resistant pseudomonads showed bi- or multi-modal MIC distributions in the intermediate-high range of concentration allowing differentiation of two or three sub-populations: one sensitive and one or two resistant sub-populations. The distinction between intrinsic and acquired resistance was determined for resistant pseudomonads which displayed bi- or multi-modal MIC distributions. In this sense, acquired resistance was detected in mesophilic *P. lundensis* (Table 1) to all antibiotics to which they showed resistance except sulfamethoxazole and ciprofloxacin. However, psychrotrophic *P. lundensis* showed acquired resistance to sulfamethoxazole, colistin, polymixin B, erythromycin and tetracycline (Table 2). Regarding mesophilic *P. putida*, acquired resistance was shown to all antibiotics except rifampicin, sulfamethoxazole, erythromycin and chloramphenicol, while in psychrotrophic *P. putida* acquired resistance to several antibiotics except gentamicin, rifampicin and

266 tetracycline was shown. With respect to other species, acquired resistance was detected  
 267 in mesophilic *P. fluorescens* and *P. alkylphenolia*, and also in psychrotrophic *P. fragi*  
 268 (Tables 1 and 2).

269 **Analysis of antibiotic resistance according to sampling zone.** Analysis of the  
 270 distribution of resistant strains throughout meat chain production revealed that  
 271 mesophilic pseudomonads were the most heterogeneous group being highly represented  
 272 by *P. lundensis* (82%) along the different zones of the meat processing plant ( Fig. 1A).  
 273 Moreover, mesophilic *P. lundensis* was isolated with high frequency in cutting room  
 274 (CR) and end products (MP) (18.8 and 16.5%, respectively) followed by white room  
 275 (WR, 11.8%) and sacrifice room (SR, 8.2%) (Fig. 1A). Similarly, psychrotrophic *P.*  
 276 *lundensis* were isolated from different zones of the meat processing plants and also in  
 277 the end products being highly isolated from the fridges F3 (16.2%) and F4 (8.1%), CR  
 278 and MP (5.4 %) followed by the fridges F2 and F1 (2.7%) (Fig. 1B).

279 Mesophilic *P. putida* were highly detected in CR (15.3%) followed by F3 (4.7%)  
 280 and E (1.2%) (Fig. 1A). However, psychrotrophic *P. putida* strains were distributed in  
 281 different slaughterhouse zones and end products being isolated from WR and CR  
 282 (8.1%), entrance (E, 5.4%) and also in MP, F1 and F4 (2.7%).

283 Concerning the rest of species, few strains of mesophilic *P. fluorescens* (1-3.5%) and  
 284 *P. alkylphenolia* (1%) were isolated especially from E and MP (*P. fluorescens*); SR and  
 285 CR (*P. alkylphenolia*). While psychrotrophic *P. fragi* was largely distributed throughout  
 286 meat processing plant until end products being mostly isolated from F3 (13.5%), F4  
 287 (8.1%) and also E, CR and WR (2.7%). Moreover, neither mesophilic nor  
 288 psychrotrophic pseudomonads were detected in freezing tunnel (FrT), and also no  
 289 psychrotrophic pseudomonads were isolated from SR (Fig. 1).

290 **Analysis of antibiotic resistance according to the type of antibiotic.** Almost all  
 291 mesophilic pseudomonads strains showed resistance to sulfamethoxazole, erythromycin,  
 292 rifampicin, amoxicillin, ampicillin, ceftazidime (except *P. alkylphenolia*),  
 293 chloramphenicol and trimethoprim regardless their identity at species level (Fig. 2A).  
 294 Similarly, psychrotrophic pseudomonads showed the same antibiotic resistance pattern  
 295 except for rifampicin and ceftazidime to which only *P. putida* and *P. fragi* showed  
 296 resistance, and also they were resistant to colistin and tetracycline (Fig. 2B). However,  
 297 all or almost all pseudomonads were very sensitive to imipinem, kanamycin,  
 298 ciprofloxacin and gentamicin (Fig. 2).

299 **MDR phenotypes and genotypes.** Multi-drug resistance (MDR, defined as  
 300 resistance to 3 or more different antimicrobials) was observed in all mesophilic and  
 301 psychrotrophic pseudomonads displaying resistance to 4 up to 13 antibiotics (Fig. 2).  
 302 Furthermore, about 65 of mesophilic and psychrotrophic pseudomonads were resistant  
 303 at least to 8-13 antibiotics (Fig. 2).

304 To identify resistance determinants responsible for the MDR phenotypes observed,  
 305 all antibiotic-resistant mesophilic and psychrotrophic pseudomonads were screened by  
 306 PCR for the presence of known resistance genes as described above. Analysis of  
 307 antibiotic resistance in all strains indicated that phenotypic and genotypic resistance  
 308 were in most cases linked, since specific and non-specific resistance determinants were  
 309 detected (Fig. 2). However, analysis of aminoglycoside-resistant pseudomonads showed  
 310 that the genes [*aad(E)*, *aphA3*, *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia*, *aph(2')-Ib*, *aph(2')-Ic*, *aph(2')-Id*,  
 311 *aph(3')-IIIa* and *ant(4')-Ia*] encoding transferases involved in gentamicin, kanamycin or  
 312 streptomycin resistance were not detected. On the other hand, both mesophilic and  
 313 psychrotrophic pseudomonad resistant strains frequently exhibited the following  
 314 resistance determinants: *bla<sub>CTX</sub>* > *bla<sub>TEM</sub>* as beta-lactam resistance genes; *sulII* > *sulI* as  
 315 sulfonamide resistance genes; *ereA* > *ereB* > *msrA*, while *mefA* was only detected in one  
 316 strain of psychrotrophic *P. putida* as erythromycin resistance gene; *catA2* > *catB3* in  
 317 psychrotrophic pseudomonads while mesophilic pseudomonads showed the opposite  
 318 situation for chloramphenicol resistance genes; *dfrD* as trimethoprim resistance gene;  
 319 and *tetQ* > *tetO-tetA* in mesophilic pseudomonads (Fig. 2A) and *tetB* > *tetQ* in  
 320 psychrotrophic pseudomonads (Fig. 32).

321 On the other hand, analysis of the partial *rpoB* gene sequences revealed that neither  
 322 of the rifampicin-resistant pseudomonads possessed a point mutation in the Rif region.  
 323 Furthermore, in the case of resistant strains which they not exhibited specific resistance  
 324 determinants to the corresponding antibiotics, efflux pumps as unspecific mechanisms  
 325 responsible of MDR phenotype were detected such as *mexB* > *mexD* > *mexY* genes  
 326 coding for MexAB-oprM, MexCD-oprJ and MexXY-oprN efflux pumps, respectively.  
 327 Furthermore, *acrB* and *tolC* genes of the AcrAB-TolC efflux system were also detected  
 328 in both mesophilic and psychrotrophic pseudomonads. However, few resistant  
 329 pseudomonad strains did not harbor any resistance determinant described above.

330 Regarding horizontal gene transfer (HGT), integron class 1 was detected in some  
 331 mesophilic and psychrotrophic pseudomonads (*P. lundensis* and *P. fragi*) isolated

throughout meat chain processing plant and also from end products (Fig. 2), furthermore integron class 2 was also detected in mesophilic pseudomonads (Fig. 2A).

#### Statistical analysis of resistance.

##### Principal component analysis of multidrug resistance in pseudomonads.

Figure 3 shows the biplot graph of the relationship between the antibiotics tested (scores) and strain variables (population type and sampling zones, loadings). Principal component analysis (PCA) of the data from the phenotypic antibiotic resistance of mesophilic and psychrotrophic pseudomonads in different slaughterhouse zones and end products resulted in three clusters for mesophiles and four clusters for psychrotrophs (Fig. 3). As shown in Fig. 3A, the first cluster represented the most resistant mesophilic pseudomonads being isolated from CR and MP, however they exhibited an opposite antibiotic resistance profile since CHL, GEN and STR were the most relevant antibiotics in CR, and PB-TET-CAZ-RIF in MP. The second cluster was formed by the less resistant mesophilic pseudomonads which were isolated from all fridges (F1, F2, F3 and F4) being CIP-GEN-KAN-PB the most relevant antibiotics. However, mesophilic pseudomonads from E, SR and WR (third cluster) occupied an intermediate position between the other clusters exhibiting resistance to a wide range of antibiotics being CIP-KAN-GEN-CHL the most relevant antibiotics in WR, and several antibiotics in SR (Fig. 3A).

On the other hand, PCA of phenotypic antibiotic resistance in psychrotrophic pseudomonads (Fig. 3B) showed that E (first cluster) and F3+F4 (second cluster) represented the clusters with higher resistances being KAN and GEN the most relevant antibiotic in E, and ERY-AMX-APM-TMP the most relevant antibiotics in F3+F4. The remaining two clusters, one represented the less resistant pseudomonads being formed by SR+F2, and the second one occupied an intermediate position and was formed by MP+F1+CR+WR. Resistance of the last two clusters was determined by a wide range of antimicrobials and the differences were less noticeable than other zones.

**Similarity analysis of multidrug resistant pseudomonads.** Figure 4 shows the dendrogram obtained when resistant population of the sampling zones and end products based on the genotypic resistance profiles was analyzed. According to this clustering (Fig. 4A), all fridges (F1, F2, F3 and F4) and WR (Group 1) had a resistant mesophilic population of pseudomonads clustered separately from SR+E (Group 2) which clustered together with CR+MP (Group 3). However, resistome-based clustering of

365 psychrotrophic pseudomonads (Fig. 4B) showed that fridges were distributed  
366 throughout almost all groups: F3 (Group 1), F4 (Group 3) and F1+F2+MP (Group 3).  
367  
368

## 369 DISCUSSION

370 Slaughterhouse is considered an ideal environment for spreading antimicrobial  
 371 resistant zoonotic pathogens that contaminate surfaces, meat products and also  
 372 wastewater (57, 58). Spread of antimicrobial resistance (AMR) genes through the food  
 373 chain increase the resistance gene pool from which both pathogens and commensals can  
 374 pick up resistance determinants being those a potential threat to public health and  
 375 ecological balance (21, 59, 60). The main microorganisms recovered from hides,  
 376 carcasses, butchered meat as well as from meat processing plant surfaces (63, 64)  
 377 include a wide spectrum of Gram-negative bacteria being *P. fluorescens* and the  
 378 psychrotrophic *P. fragi*, *P. lundensis* and *P. putida* the most relevant spoilage agents of  
 379 fresh meat stored aerobically (39, 68-71). In the present study, MDR pseudomonads  
 380 (100% of strains isolated in this study) were isolated from all slaughterhouse zones  
 381 (77%) -except freezing tunnel- and also from the end products (23%) being represented  
 382 mainly by *P. lundensis* (65%) and *P. putida* (17%) followed by *P. fragi* (8%), *P.*  
 383 *fluorescens* (6%) and *P. alkylphenolia* (4%). The high genetic relatedness of mesophilic  
 384 and psychrotrophic pseudomonads and that some isolates showed identical or highly  
 385 similar ERIC-PCR profiles although they were isolated from different zones (entrance,  
 386 sacrifice room, fridges, cutting room and White room) or even from the end products  
 387 suggest that the main sources of the identical or related pseudomonad strains were the  
 388 animals (feet and wool) and the slaughterhouse environment. So contaminated carcasses  
 389 with environmental bacteria may spread pseudomonads throughout all the  
 390 slaughterhouse zones until the end products. In this sense, isolation pseudomonads from  
 391 living animals and comparison with slaughterhouse strains deserves further studies.

392 MDR phenotypes (4-13 antibiotics) were detected in both mesophilic and  
 393 psychrotrophic pseudomonads being resistant to sulfamethoxazole, erythromycin,  
 394 amoxicillin, ampicillin, chloramphenicol, trimethoprim, rifampicin and ceftazidime  
 395 (especially mesophiles), and colistin and tetracycline (especially psychrotrophes)  
 396 regardless the species identity. However, low percentage of resistant pseudomonads was  
 397 obtained with ciprofloxacin, gentamicin, imipenem and kanamycin.. The most resistant  
 398 mesophilic pseudomonads especially *P. lundensis* strains were frequently isolated from  
 399 cutting room and meat products. However, resistant psychrotrophic pseudomonads were  
 400 highly isolated from fridges (F3 and F4). Multidrug resistance of pseudomonads is due  
 401 to multiple intrinsic or acquired mechanisms such as the low permeability of the outer  
 402 membrane (20, 72-74), the production of beta-lactamases and the presence of multidrug

403 efflux pumps with wide substrate profiles (72, 75). Worryingly, in the present study we  
 404 found multidrug resistance up to 13 antibiotics (65% of pseudomonads resistant to 8-13  
 405 antibiotics) being due to practically all known mechanisms of antimicrobial resistance.  
 406 The increase in antibiotic resistance of pseudomonads isolated from slaughterhouse  
 407 environment can be due to several reasons such as the use of antimicrobials (biocides  
 408 and antibiotics) that could enhance gene transfer and recombination through the  
 409 activation of the SOS system (76, 77), temperature of storage, growth in biofilm and the  
 410 presence of pathogens as potential reservoir of resistance genes. .

411 The high resistance of pseudomonads to beta-lactams (ampicillin, amoxicillin and  
 412 ceftazidime) was related to the presence of plasmid mediated extended spectrum beta  
 413 lactamases (ESBLs) encoded by *bla<sub>CTX</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV-1</sub>* and *bla<sub>OXA</sub>* genes. So the  
 414 observed acquired resistance of mesophilic and psychrotrophic pseudomonads reflected  
 415 by the bi- or multi-modal MIC distributions was due to the acquisition in most cases of  
 416 *bla<sub>CTX</sub>* and *bla<sub>TEM</sub>* genes by horizontal gene transfer (insertion sequences, integrons  
 417 “classe 1”, transposons, plasmids). However, only some strains exhibited the presence  
 418 of class 1 and 2 integrons. It should be noted that independent acquisition of mobile  
 419 elements carrying *bla* genes, *bla<sub>CTX</sub>* gene or *bla<sub>TEM</sub>* gene, can lead to the simultaneous  
 420 occurrence of more than one gene in the same strain.

421 Concerning chloramphenicol, *catA2* or *catB3* resistance genes prevalent in  
 422 psychrotrophic and mesophilic pseudomonads, respectively are widespread in many  
 423 bacteria (44) suggesting that the observed acquired resistance was due to horizontal  
 424 gene transfer. On the other hand, acquisition of sulfamethoxazole (*sulIII*) resistance gene  
 425 -being predominantly found on plasmids and associated with class 1 integron (78, 79)-  
 426 via horizontal gene transfer by pseudomonads was reported in enteric bacteria isolated  
 427 from healthy food animals and humans (80, 81) being *sulIII* the most prevalent gene in  
 428 the absence of clinical selection pressure (82). Here, the genes *catA2* and *sulIII* acquired  
 429 by psychrotrophic *P. fragi* in entrance was probably due to the presence of class 1  
 430 integron in those strains acquired from other microorganisms of the environment or the  
 431 animals and may be responsible of the spread of those genes throughout meat chain  
 432 production.

433 Resistance to tetracycline (*tetA*, *tetB*, *tetO* and *tetQ* genes), trimethoprim (*dfrD* gene)  
 434 and erythromycin (*ereA*, *ereB*, *msrA* and *mefA* genes) was partially due to the presence  
 435 of the corresponding resistance genes being *ereA* and *tetQ* genes the most prevalent.  
 436 The genes *tetO* and *tetQ* were found to be predominant in the gastrointestinal tracts of



437 pigs and steers and also in the manure (83) being often associated with conjugative  
 438 transposons (83, 84). In the present study, the occurrence of acquired *tetQ* and *ereA*  
 439 genes in *P. putida* from entrance may suggest that the source of those genes may be  
 440 related with animals or entrance environment.

441 Genetic linkage of *sulII*, *dfrD* or *tet* genes to determinants such as *bla<sub>CTX</sub>*/*bla<sub>TEM</sub>*  
 442 conferring resistance to beta-lactams was due in part to the presence of class 1 integron  
 443 (17%) implicated in the carriage and the genetic mobility of resistance genes (85, 86),  
 444 thus beta-lactams still commonly used might help explain persistence of those genes  
 445 and then increase in MDR of pseudomonads in slaughterhouse. Accordingly, Tadesse et  
 446 al. (87) established linkage between sulfonamide resistance genes and determinants  
 447 conferring resistance to tetracycline and streptomycin. MDR of pseudomonads lacking  
 448 specific genetic resistance determinants may be due to other mechanisms such as drug  
 449 efflux pumps with a wide spectrum of activity (MexAB-oprM, MexCD-OprJ, MexXY-  
 450 oprM and AcrAB-TolC, 52%) being *mexB*, *mexD* and *acrB* coding genes highly  
 451 detected. Those efflux pumps act synergistically with the permeability barrier to result  
 452 in significant intrinsic resistance to many antibiotics (88-91).

453 Correlation of resistances in pseudomonads using PCA of sampling zones and end  
 454 products determined that cutting room (CR) and meat products (MP) are considered the  
 455 main sources of antibiotic resistant mesophilic pseudomonads, although they showed an  
 456 opposite behaviour concerning relevance of antibiotics to determine resistance. The  
 457 most resistant psychrotrophic pseudomonads were isolated from F3, F4 and E.  
 458 However, resistome-based clustering did not support this conclusion being mesophilic  
 459 pseudomonads from CR and MP (Group 3) highly related and shared the same source of  
 460 resistance determinants with E and SR (Group 2), as occurred also with psychrotrophic  
 461 pseudomonads from F3 (Group 1), F4 (Group 3) and F1+F2 (Group 5). Those data  
 462 suggested a clear divergence between phenotypic and genotypic resistance of  
 463 pseudomonads in a slaughterhouse environment since specific and unspecific  
 464 mechanisms induced by a wide range of antibiotics may occur in different zones. Often,  
 465 more than one gene was associated with a given phenotypic resistance.

466 In summary, we revealed for the first time a high prevalence of MDR pseudomonads  
 467 in goat and lamb slaughterhouse surfaces to commonly used antibiotics which may  
 468 reflect the misuse or abuse of the antimicrobial agents in animals and the environment.  
 469 Furthermore, the high similarity between different slaughterhouse surfaces and end  
 470 products regarding phenotypic and molecular antibiotic resistance profiles of MDR



pseudomonads isolated in this study suggested that meat products may play a potential role as reservoir of resistance determinants to be spread to human pathogens. Following the high slaughterhouse surface contamination with MDR pseudomonads, it must be assumed that these highly resistant microorganisms can also be directly transmitted to humans by transport, transaction and by food preparation. The relationship between environmental microorganisms and human pathogens is not clear, however recent reports showed that soil bacteria and human pathogens shared an antibiotic resistome (92) and also animals and farm workers (60, 93, 94). Considering that entrance (the first zone in a goat and lamb slaughterhouse where animals should be kept for a determined time period before sacrifice) shared several resistance determinants with end products implicated in resistance to several antibiotics (about 6), we can suggest that entrance where some antibiotic resistance determinants were detected for the first time (*catA2* and *sulII*) is the key zone in antibiotic resistance to be spread throughout different slaughterhouse zones until end products. Furthermore, other zones such as cutting room and fridges where most MDR pseudomonads were isolated should be exhaustively controlled especially F1 (about 6 resistance determinants acquired) which was located between SR and CR. This fact must be taken into consideration to avoid cross-contamination with subsequent flow of mobile resistance determinants throughout all slaughterhouse zones and then to avoid spread of resistance to human and the environment by the application of adequate practices of hygiene and disinfection measures including animal wool and feet and also the entrance environment. Practical strategies could be applied in slaughterhouse including good husbandry to prevent disease, and also good hygiene of animals before access to entrance in Pre-Entrance room (P-E) which could be created with the aim to apply brief shower to eliminate the majority of microorganisms from wool and feet.

496  
497

#### 498 **Acknowledgements**

499 This work was supported by grants AGL2009-08921, P08-AGR-4295, Plan propio  
500 de la Universidad de Jaén, and Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario  
501 CeIA3. Leyre Lavilla Lerma was beneficiary of a fellowship from Spanish Ministry of  
502 Education and Science.

503

## References

1. **Brady MT, Feigin RD.** 1998. *Pseudomonas* and related species, p 1401-1413. In Feigin RD, Cherry JD (eds), Textbook of pediatric infectious diseases. Saunders WB, Philadelphia, U.S.A.
2. **Prasad G, Minakshi.** 2007. In Immunology and Medical Microbiology, p 1-23. Normal microbial flora of human body and host parasite relationship. National Science Digital Library.
3. **Ridgway HF, Safarik J.** 1990. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. Appl. Environ. Microbiol. **56**:3565-3575
4. **Bender CL, Alarcon-Chaidez F, Gross DC.** 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**:266–292.
5. **Deeth HC, Fitz-Gerald CH.** 1983. Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products, p 195-239. In Fox PF (ed), Developments in dairy chemistry. Applied Science, London
6. **Reddy MC, Bills DD, Lindsey RC, Libbey LM.** 1968. Ester production by *Pseudomonas fragi*. I. Identification and quantification of some esters produced in milk cultures. J. Dairy Sci. **51**:656–659.
7. **Ternstrom A, Lindberg A-M, Molin G.** 1993. Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. J. Appl. Bacteriol. **75**:25–34.
8. **Nguyen-the C, Carlin F.** 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **34**:371–401.
9. **Riva M, Franzetti L, Galli A.** 2001. Microbiological quality of shelf-life modelling of ready to eat cicorino. J. Food Prot. **64**: 228-234.
10. **Molin G, Ternstrom A.** 1986. Phenotypically based taxonomy of psychrotrophic *Pseudomonas* isolated from spoiled meat, water and soil. Int. J. Syst. Bacteriol. **36**:257-274.
11. **Miller IIIA, Scanlan RA, Lee JS, Libbey LM.** 1993. Identification of volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas fragi*. Appl. Microbiol. **25**:952-955
12. **Tryfinopoulou P, Tsakalidon E, Nychas G-JE.** 2002. Characterization of *Pseudomonas* sp. associated with spoilage of Gilt-head sea bream stored under various conditions. Appl. Environ. Microbiol. **68**:65-72.
13. **Garcia-Lopez I, Otero A, Garcia-Lopez M-L, Santos JA.** 2004. Molecular and phenotypic characterization of nonmotile Gram-negative bacteria associated with spoilage of freshwater fish. J. Applied Microbiol. **96**:878-886.
14. **Wiedmann M, Weilmeier D, Dineen SS, Ralyea RM, Boor KJ.** 2000. Molecular and Phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. Appl. Environ. Microbiol. **66**:2085-2095.
15. **Arnaut-Rollier I, Vauterin L, De Vos P, Massart DL, Devriese LA, De Zutter L, Van Hoof J.** 1999. A numerical taxonomic study of the *Pseudomonas* flora isolated from poultry meat. J. Appl. Microbiol. **87**:15-28.
16. **Levy SB.** 1997. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. Ciba Foundation Symposium **207**:1–9.
17. **Breidenstein EBM, de la Fuente-Nuñez C, Hancock REW.** 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends Microbiol. **19**:419-426.

- 553 18. **DeFlaun MF, Levy SB.** 1989. Genes and their varied hosts, p 1-32. *In* Levy SB,  
554 Miller RV (ed), Gene transfer in the environment. McGraw-Hill, New York.
- 555 19. **Miko A, Pries K, Schroeter A, Helmuth R.** 2005. Molecular mechanisms of  
556 resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods  
557 in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:1025–1033.
- 558 20. **De Oliveira KMP, Pericles DDS, GRISOLIA AB.** 2013. Antimicrobial  
559 susceptibility profile of *Pseudomonas* spp. isolated from a swine slaughterhouse in  
560 Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Rev. Argent. Microbiol.* **45**:57-60.
- 561 21. **Gregova G, Kmetova M, Kmet V, Venglovsky J, Feher A.** 2012. Antibiotic  
562 resistance of *Escherichia coli* isolated from a poultry slaughterhouse. *Ann. Agri.*  
563 *Env. Med.* **19**:75-7.
- 564 22. **Schwaiger K, Huthner S, Hölzel C, Kämpf P, Bauer J.** 2012. Prevalence of  
565 antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from chicken and pork meat  
566 purchased at the slaughterhouse and at retail in Bavaria, Germany. *Int. J. Food*  
567 *Microbiol.* **154**:206-211.
- 568 23. **Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon P.** 2008. Resistance in bacteria of the  
569 food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*  
570 **6**:733–750.
- 571 24. **Davies J, Davies D.** 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol.*  
572 *Mol. Biol. Rev.* **74**:417–433.
- 573 25. **Durán GM, Marshall DL.** 2005. Ready-to-eat shrimp as an international vehicle of  
574 antibiotic-resistant bacteria. *J. Food Prot.* **68**:2395–2401.
- 575 26. **Wang HH, Manuzon M, Lehman M, Wan K, Luo HL, Wittum TE, Yousef A,**  
576 **Bakaletz LO.** 2006. Food comensal microbes as a potentially important avenue in  
577 transmitting antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**:226–231.
- 578 27. **Wegener, H.C.** 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance  
579 development. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:439–445.
- 580 28. **Munsch-Alatossava P, Alatossava T.** 2007. Antibiotic resistance of raw milk  
581 associated psychrotrophic bacteria. *Microbiol. Res.* **162**:115–123.
- 582 29. **Dixon B.** 2000. Antibiotics as growth promoters: risks and alternatives. *ASM News*  
583 **66**:264–265.
- 584 30. **Feinman SE.** 1999. Antibiotics in animal feeds—drug resistance revisited. *ASM*  
585 *News* **64**:24–29.
- 586 31. **SCAN.** 1996. Report of the Scientific Committee for Animal Nutrition (SCAN) on  
587 the possible risk for humans on the use of avoparcin as feed additive. Opinion  
588 expressed 21 May 1996. Office for EC Publications, Luxemburg.
- 589 32. **SCAN.** 1998. Opinion of the Scientific Committee for Animal Nutrition (SCAN) on  
590 the immediate and long-term risk to the value of streptogramins in human medicine  
591 posed by the use of virginiamycin as an animal growth promoter. Office for EC  
592 Publications, Luxemburg .
- 593 33. **Levy SB.** 1998. The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American* **278**:22–  
594 39.
- 595 34. **Lavilla Lerma L, Benomar N, Gálvez A, Abriouel H.** 2013. Prevalence of  
596 bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces  
597 throughout meat chain production. *Int. J. Food Microbiol.* **161**:97–106.
- 598 35. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2009. Performance standards for  
599 antimicrobial susceptibility testing. *In* Nineteenth informational supplement, Vol. 29.  
600 CLSI, Wayne, PA.

- 601 36. **De los Reyes-Gavilan CG, Limsowtin GKY, Tailliez P, Séchaud L, Acholas JP.**  
602 1992. A *Lactobacillus helveticus*-specific DNA probe detects restriction fragment  
603 length polymorphisms in this species. Appl. Environ. Microbiol. **58**:3429-3432.
- 604 37. **Martin-Platero AM, Valdivia E, Maqueda M, Martínez-Bueno M.** 2009.  
605 Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats'  
606 milk cheeses. Int. J. Food Microbiol. **132**:24-32.
- 607 38. **Yamamoto S, Kasai H, Arnold DL, Jackson RW, Vivian A, Harayama S.** 2000.  
608 Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the  
609 nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. Microbiol. **146**:2385-94.
- 610 39. **Ercolini D, Russo F, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F.** 2007.  
611 Simultaneous Detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from  
612 Meat by Use of a Multiplex PCR Assay Targeting the *carA* Gene. Appl. Environ.  
613 Microbiol. **73**:2354-2359.
- 614 40. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2012. Performance standards for  
615 antimicrobial susceptibility testing; 22nd informational supplement. CLSI document  
616 M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 617 41. **Bruchmann J, Kirchen S, Schwartz, T.** 2013. Sub-inhibitory concentrations of  
618 antibiotics and wastewater influencing biofilm formation and gene expression of  
619 multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* wastewater isolates. Environ. Sci. Pollut.  
620 Res. **20**:3539-3549.
- 621 42. **Tribuddharat C, Fennewald M.** 1999. Integron-Mediated Rifampin Resistance in  
622 *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **43**:960-962.
- 623 43. **Birkett C, Ludlam H, Woodford N, Brown D, Brown N, Roberts M, Milner N,**  
624 **Curran M.** 2007. Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes  
625 encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. J. Med. Microbiol. **56**:52-55.
- 626 44. **Kim M, Kwon TH, Jung SM, Cho SH, Jin SY, Park NH, Kim CG, Kim JS.**  
627 2013. Antibiotic Resistance of Bacteria Isolated from the Internal Organs of Edible  
628 Snow Crabs. PLoS One. **8**:e70887.
- 629 45. **Klare I, Konstabel C, Werner G, Huys G, Vankerckhoven V, Kahlmeter G,**  
630 **Hildebrandt B, Müller-Bertling S, Witte W, Goossens H.** 2007. Antimicrobial  
631 susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and  
632 cultures intended for probiotic or nutritional use. J. Antimicrob. Chemother. **59**:900-  
633 912.
- 634 46. **Knapp CW, Zhang W, Sturm BS, Graham DW.** 2010. Differential fate of  
635 erythromycin and beta-lactam resistance genes from swine lagoon waste under  
636 different aquatic conditions. Environ. Pollut. **158**:1506-12.
- 637 47. **Ng L-K, Martin I, Alfo M, Mulvey M.** 2001. Multiplex PCR for the detection of  
638 tetracycline resistance genes. Mol. Cell. Probes **15**:209-215.
- 639 48. **Pei R, Kim S-C, Carlson KH, Pruden A.** 2006. Effect of river landscape on the  
640 sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes  
641 (ARG). Water Res. **40**:2427-2435.
- 642 49. **Spiliopoulou I, Petinaki E, Papandreou P, Dimitracopoulos G.** 2004. erm(C) is  
643 the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides  
644 among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. J.  
645 Antimicrob. Chemother. **53**:814-817.
- 646 50. **Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L.** 1996. Detection of  
647 erythromycin-resistant determinants by PCR. Antimicrob. Agents Chemother.  
648 **40**:2562-2566.

- 649 51. **Oh H, Stenhoff J, Jalal S, Wretling B.** 2003. Role of Efflux Pumps and Mutations  
650 in Genes for Topoisomerases II and IV in Fluoroquinolone-Resistant *Pseudomonas*  
651 *aeruginosa* Strains. *Microb. drug Resis.* **9**:323-328.
- 652 52. **Swick MC, Morgan-Linnell SK, Carlson KM, Zechiedrich L.** 2011. Expression  
653 of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli*  
654 clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance.  
655 *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:921-924.
- 656 53. **Hosokawa K, Park N-H, Inaoka T, Itoh Y, Ochi K.** 2002. Streptomycin-resistant  
657 (*rpsL*) or rifampicin-resistant (*rpoB*) mutation in *Pseudomonas putida* KH146-2  
658 confers enhanced tolerance to organic chemicals. *Environ. Microbiol.* **4**:703-712.
- 659 54. **White PA, McIver CJ, Deng YM, Rawlinson WD.** 2000. Characterisation of two  
660 new gene cassettes, *aadA5* and *dfrA17*. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**:265-269.
- 661 55. **Ploy MC, Denis F, Courvalin P, Lambert T.** 2000. Molecular characterization of  
662 integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron.  
663 *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2684-2688.
- 664 56. **Mauriello G, Casaburi A, Villani F.** 2002. Proteolytic activity of *Staphylococcus*  
665 *xylosus* strains on pork myofibrillar and sarcoplasmic proteins and use of selected  
666 strains in the production of "Naples type" salami. *J. Appl. Microbiol.* **92**:482-490.
- 667 57. **Tsola E, Drosinos EH, Zoiopoulos P.** 2008. Impact of poultry slaughter house  
668 modernisation and updating of food safety management systems on the  
669 microbiological quality and safety of products. *Food Control* **19**:423-431.
- 670 58. **Romanova NA, Gawande PV, Brovko LY, Griffiths MW.** 2007. Rapid methods  
671 to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes*  
672 biofilms. *J. Microbiol. Meth.* **71**:231-237.
- 673 59. **Hammerum A, Heuer O.** 2009. Human health hazards from antimicrobial-resistant  
674 *Escherichia coli* of animal origin. *Clin. Infect. Dis.* **48**:916-921.
- 675 60. **Van den Bogaard A, London N, Driessen C, Stobberingh E.** 2001. Antibiotic  
676 resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry  
677 slaughterers. *J. Antimicrob. Chemoth.* **47**:763-771.
- 678 61. **Silbergeld E, Graham J, Price L.** 2008. Industrial food animal production,  
679 antimicrobial resistance, and human health. *Annu. Rev. Public Health.* **29**:151-169.
- 680 62. **Wright G.** 2010. Antibiotic resistance in the environment: A link to the clinic?  
681 *Curr. Opin. Microbiol.* **13**:589-594.
- 682 63. **European Food Safety Authority.** 2010a. Scientific Report. 2010. The Community  
683 Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria  
684 from animals and food in the European Union in 2004-2007. *EFSA J.* **8**:1309.
- 685 64. **European Food Safety Authority.** 2010b. Community summary reports on trend  
686 and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and food borne  
687 outbreaks in the European Union 2008. *EFSA J.* **8**:1496.
- 688 65. **WHO.** 2011. Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in  
689 Europe. 1-70.
- 690 66. **Hammer GF.** 1987. Meat processing: ripened products. *Fleischwirtschaft* **67**:71-74.
- 691 67. **Gill CO.** 2005. Sources of microbial contamination and slaughtering plants, p 231-  
692 243. *In* Sofos JN (ed), *Improving the safety of fresh meat*. CRC/Wood head  
693 Publishing Limited, Cambridge, UK
- 694 68. **Labadie J.** 1999. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an  
695 ecological niche. *Meat Sci.* **52**:299-305.
- 696 69. **Gill CO.** 2003. Active packaging in practice: meat, p 378-396. *In* Ahvenainen H  
697 (ed), *Novel food packaging technology*. Woodhead Publishing Limited and CRC  
698 Press LLC, Boca Raton, FL.



- 699 70. **Gennari M, Dragotto F.** 1992. A study of the incidence of different fluorescent  
700 *Pseudomonas* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and  
701 fish, raw milk, cheese, soil and water. *J. Appl. Bacteriol.* **72**:281-8.
- 702 71. **Stanbridge LH, Davies AR.** 1998. The microbiology of chill-stored meat, p 175-  
703 177. In Davies A, Board R (ed), *Microbiology of meat and poultry*. Blackie  
704 Academic & Professional, London, United Kingdom.
- 705 72. **Nikaido H.** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability  
706 barriers and active efflux. *Science* **264**:382-388.
- 707 73. **Nikaido H.** 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*  
708 **178**:5853-9.
- 709 74. **Juan C, Zamorano L, Mena A, Albertí S, Pérez JL, Oliver A.** 2010. Metallo- $\beta$ -  
710 lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance  
711 elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. *J.*  
712 *Antimicrob. Chemother.* **65**:474-478.
- 713 75. **Henwood CJ, Livermore DM, James D, Warner M.** 2001. Antimicrobial  
714 susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of a UK survey and evaluation of  
715 the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test. *J.*  
716 *Antimicrob. Chemother.* **47**:789-99.
- 717 76. **Couce A, Blazquez J.** 2009. Side effects of antibiotics on genetic variability. *FEMS*  
718 *Microbiol. Rev.* **33**:531-538.
- 719 77. **Guerin E, Cambray G, Da Re S, Mazel D, Ploy MC.** 2010. The SOS response  
720 controls antibiotic resistance by regulating the integrase of integrons. *Med. Sci.* **1**:28-  
721 30.
- 722 78. **Radstrom P, Swedberg G, Skold O.** 1991. Genetic analyses of sulfonamide  
723 resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R  
724 plasmid evolution. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1840-1848.
- 725 79. **Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR.** 2009. Gene cassettes and cassette  
726 arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**:757-784.
- 727 80. **Enne VI, Livermore DM, Stephens P, Hall LMC.** 2001. Persistence of  
728 sulfonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing  
729 restriction. *Lancet.* **357**:1325-1328.
- 730 81. **Kozak GK, Pearl DL, Parkman J, Reid-Smith RJ, Deckert A, Boerlin P.** 2009.  
731 Distribution of sulfonamide resistance genes in *Escherichia coli* and *Salmonella*  
732 isolates from swine and chickens at abattoirs in Ontario and Quebec, Canada. *Appl.*  
733 *Environ. Microbiol.* **75**:5999-6001.
- 734 82. **Enne VI, Bennett PM, Livermore DM, Hall LM.** 2004. Enhancement of host fi  
735 tness by the sul2-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *J.*  
736 *Antimicrob. Chemother.* **53**:958-63.
- 737 83. **Zhu YG, Johnson TA, Su J-Q, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, Hashsham SA,**  
738 **Tiedje JM.** Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms.  
739 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**:3435-3440.
- 740 84. **Leng Z, Riley DE, Berger RE, Krieger JN, Roberts MC.** 1997. Distribution and  
741 mobility of the tetracycline resistant determinant Tet Q. *J. Antimicrob. Chemother.*  
742 **40**:551-559.
- 743 85. **Lynne AM, Kaldhone P, David D, White DG, Foley SL.** 2009. Characterization  
744 of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolated from  
745 food animals. *Foodborne Pathog. Dis.* **6**:207-15.
- 746 86. **Gaze WH, Abdoulsam N, Hawkey PM, Wellington EM.** 2005. Incidence of class  
747 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment.  
748 *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1802-7.

- 749 87. **Tadesse DA, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Bartholomew MJ, McDermott**  
750 **PF.** 2012. Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food  
751 Animals, United States, 1950–2002. *Emerg. Infect. Dis.* **18**:741-749.
- 752 88. **Poole K, Krebs K, McNally C, Neshat S.** 1993. Multiple antibiotic resistance in  
753 *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J.*  
754 *Bacteriol.* **175**:7363-7372.
- 755 89. **Li X-Z, Livermore DM, Nikaido H.** 1994. Role of efflux pump(s) in intrinsic  
756 resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to tetracycline, chloramphenicol  
757 and norfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1732- 1741.
- 758 90. **Zgurskaya HI, Nikaido H.** 2000. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux  
759 across two membranes. *Mol Microbiol.* **37**:219-25.
- 760 91. **Jeffrey R. Aeschlimann Pharm.D.** 2003. The Role of Multidrug Efflux Pumps in  
761 the Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and Other Gram-Negative  
762 Bacteria Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists.  
763 *Pharmacotherapy* **23**:916–924.
- 764
- 765 92. **Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MOA, Dantas G.** 2012.  
766 The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. *Science*  
767 **337**: 1107-1111.
- 768 93. **Smith TC, Gebreyes WA, Abley MJ, Harper AL, Forshey BM, Male MJ,**  
769 **Martin HW, Molla BZ, Sreevatsan S, Thakur S, Thiruvengadam M, Davies PR.**  
770 2013. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs and Farm Workers on  
771 Conventional and Antibiotic-Free Swine Farms in the USA. *PLOS ONE* **8**:e63704.
- 772 94. **Zhang XY, Ding LJ, Yue J.** 2009. Occurrence and characteristics of class 1 and  
773 class 2 integrons in resistant *Escherichia coli* isolates from animals and farm workers  
774 in Northeastern China. *Microb. Drug Resist.* **15**:323-328.
- 775

776 **Figure legends.**

777

778 **Figure 1.** Resistance to antibiotics of mesophilic (A) and psychrotrophic (B)  
779 pseudomonads isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production  
780 and from the end products according to the species identity [*P. alkylphenolia* ( ), *P.*  
781 *fluorescens* ( ), *P. lundensis* ( ), *P. putida* ( ), *P. fragi* ( )].

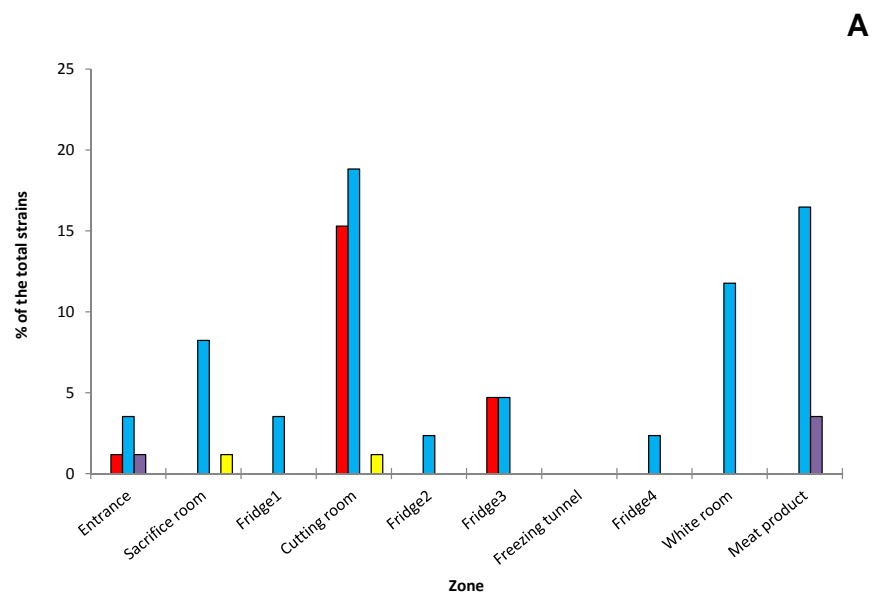
782 **Figure 2.** A heat-map summary of MDR phenotypes and genotypes, proteolytic activity  
783 and the sources of mesophilic (A) and psychrotrophic (B) pseudomonads isolated from  
784 slaughterhouse surfaces throughout meat chain production and from the end products.  
785 The level of resistance is indicated by green scale (R, resistant and S, susceptible; B,  
786 breaking point). Antimicrobial abbreviations: AMP, ampicillin; AMX, amoxicillin;  
787 CAZ, ceftazidime; CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; CL, colistin; ERY,  
788 erythromycin; GEN, gentamicin; IPM, imipenem; KAN, kanamycin; PB, polymixin B;  
789 RIF, rifampicin; SMX, sulfamethoxazole; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TMP,  
790 trimethoprim.

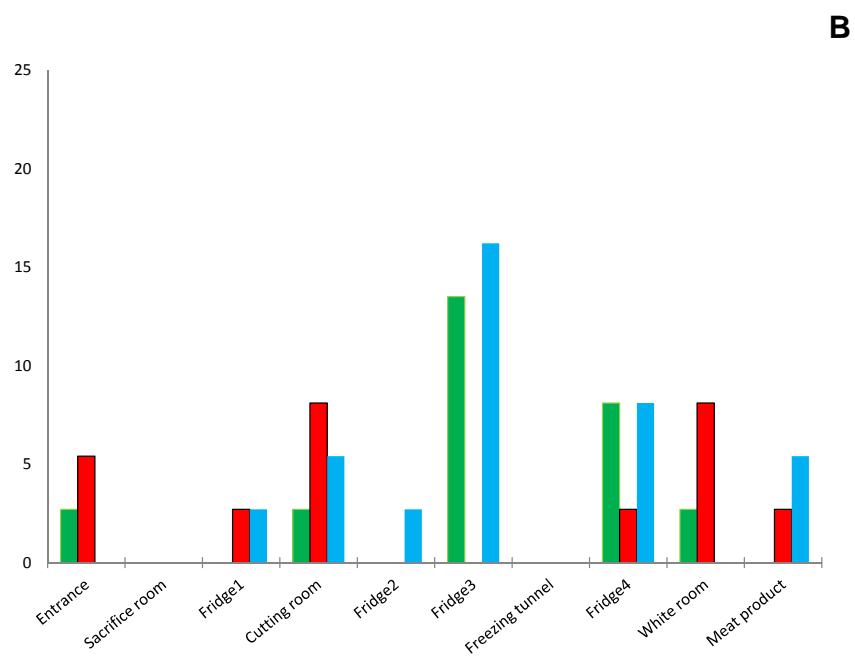
791 **Figure 3.** Biplot of the simultaneous evaluation of the relationship of scores (antibiotics)  
792 and sample variables (sampling zone and population type, A: mesophilic  
793 pseudomonads, B: psychrotrophic pseudomonads). Antibiotics: AMP, ampicillin;  
794 AMX, amoxicillin; CAZ, ceftazidime; CIP, Ciprofloxacin; CL, Colistin; CHL ,  
795 Chloramphenicol; ERY, Erythromycin; GEN, Gentamicin; IPM, Imipenem; KAN,  
796 Kanamycin; PB, Polymixin B; RIF, Rifampicin; SMZ, Sulfametoxazol; STR,  
797 Streptomycin; TET, Tetracycline; TMP, Trimethoprim.

798 **Figure 4.** Dendrogram showing mesophilic (A) and psychrotrophic (B) pseudomonad  
799 population clusters of goat and lamb slaughterhouse sampling zones from entrance and  
800 sacrifice room until end-products typed by resistomes. Hierarchical cluster analysis for  
801 multiple antibiotic resistance patterns was performed by using the Ward method for  
802 clustering and the square Euclidean distance for distance measures.

803

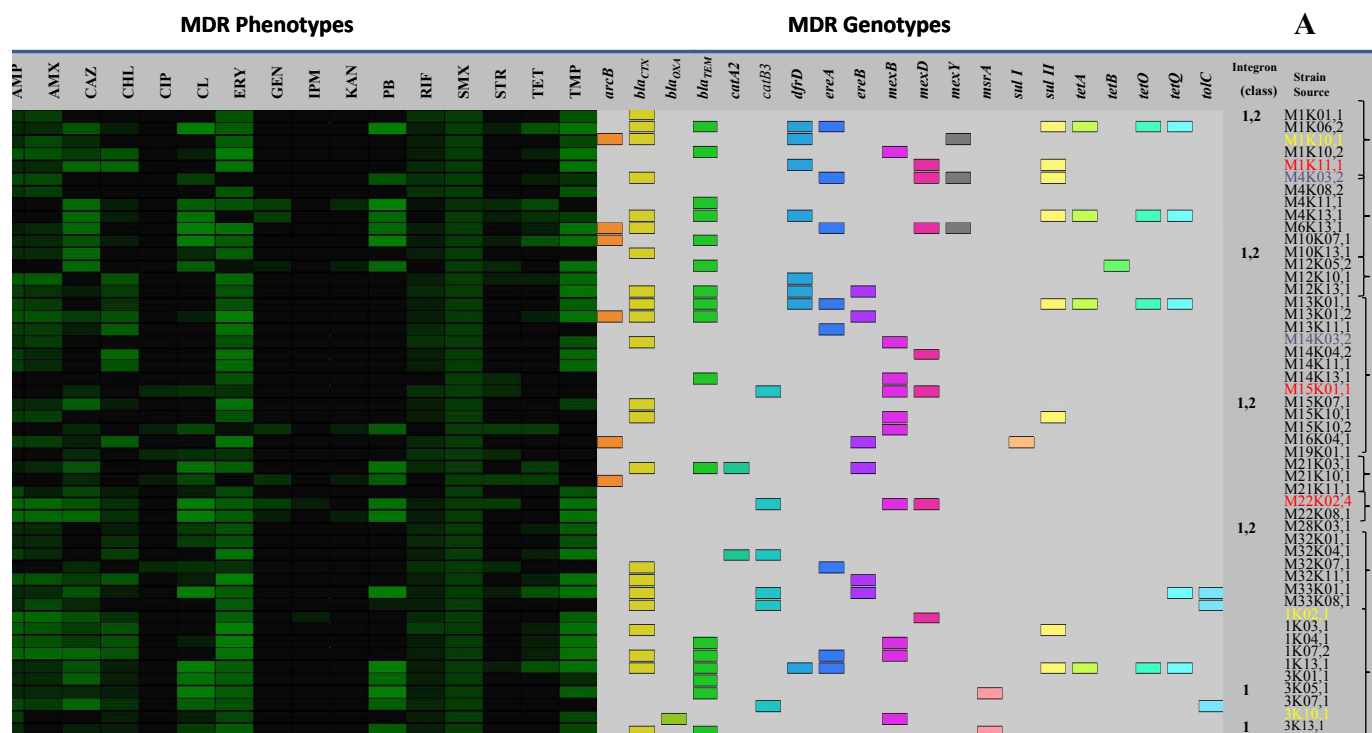


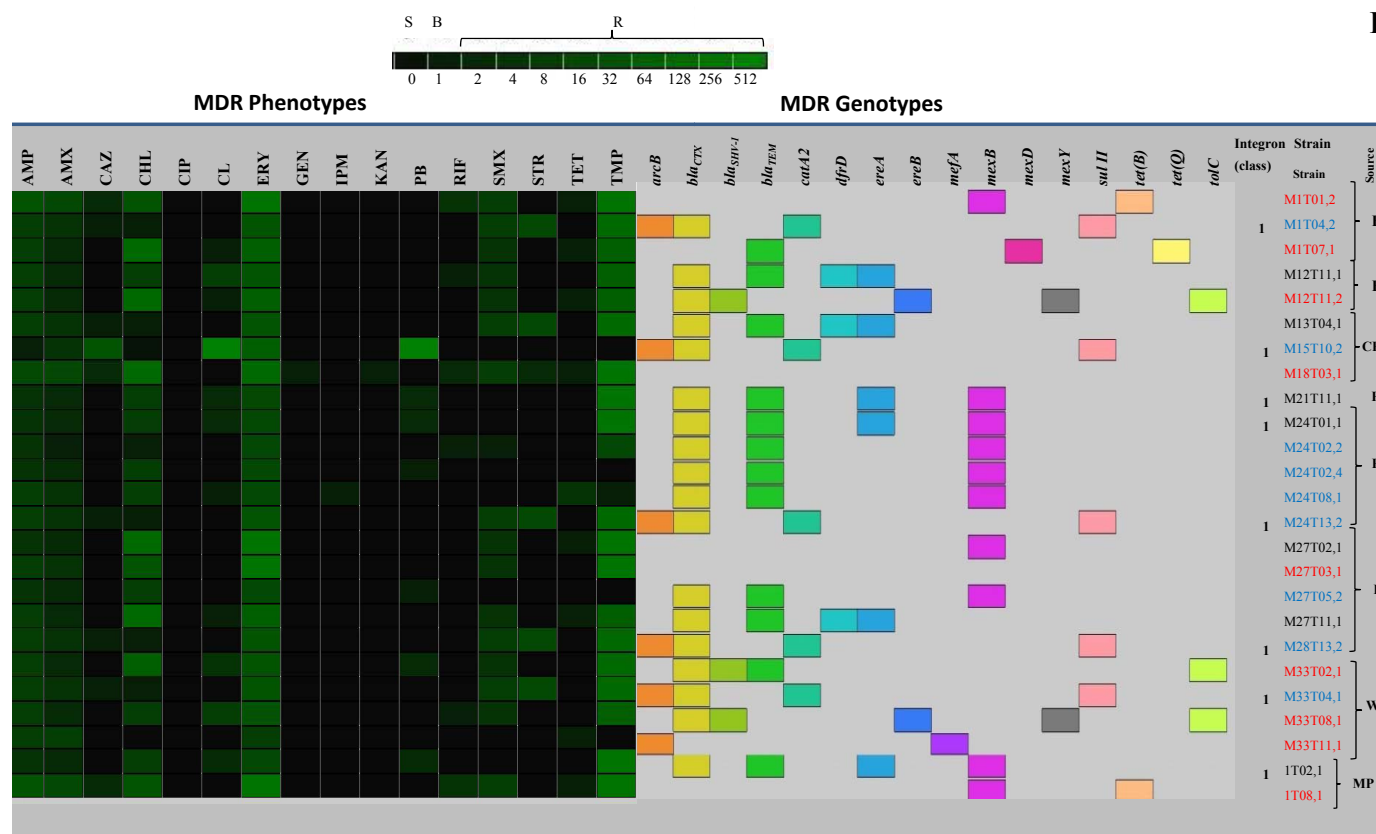




**Figure 1**

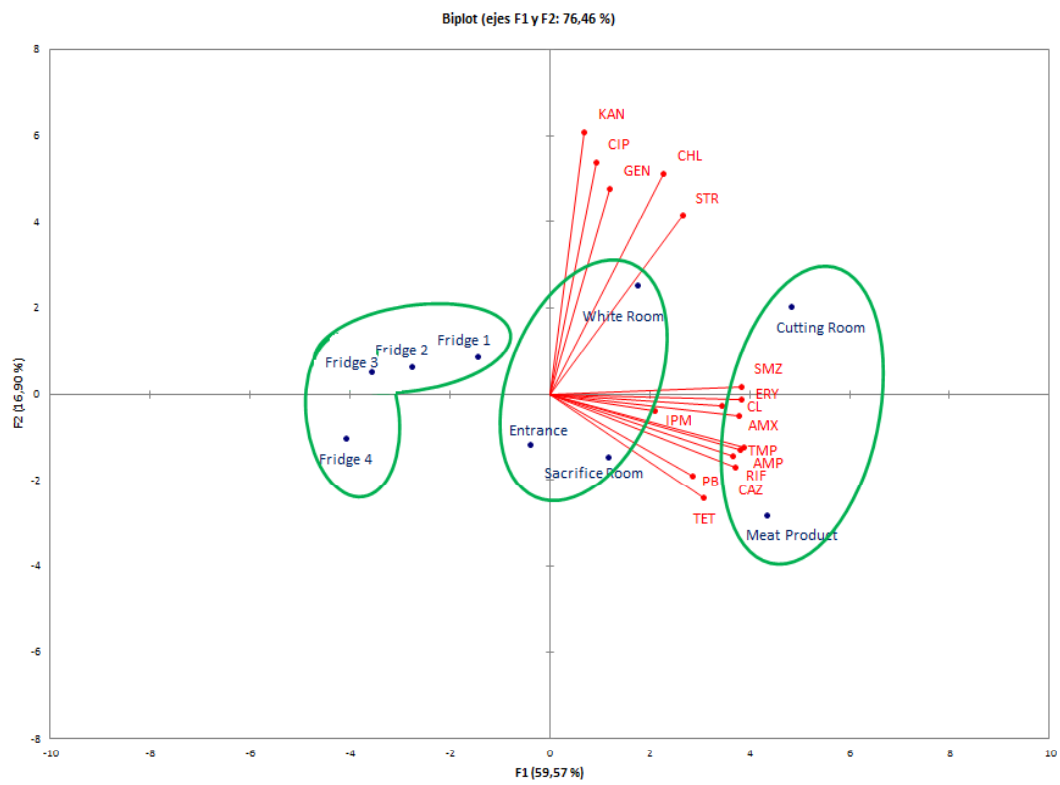
**Lavilla Lerma et al.**





**Figure 2**

**Lavilla Lerma et al.**



A

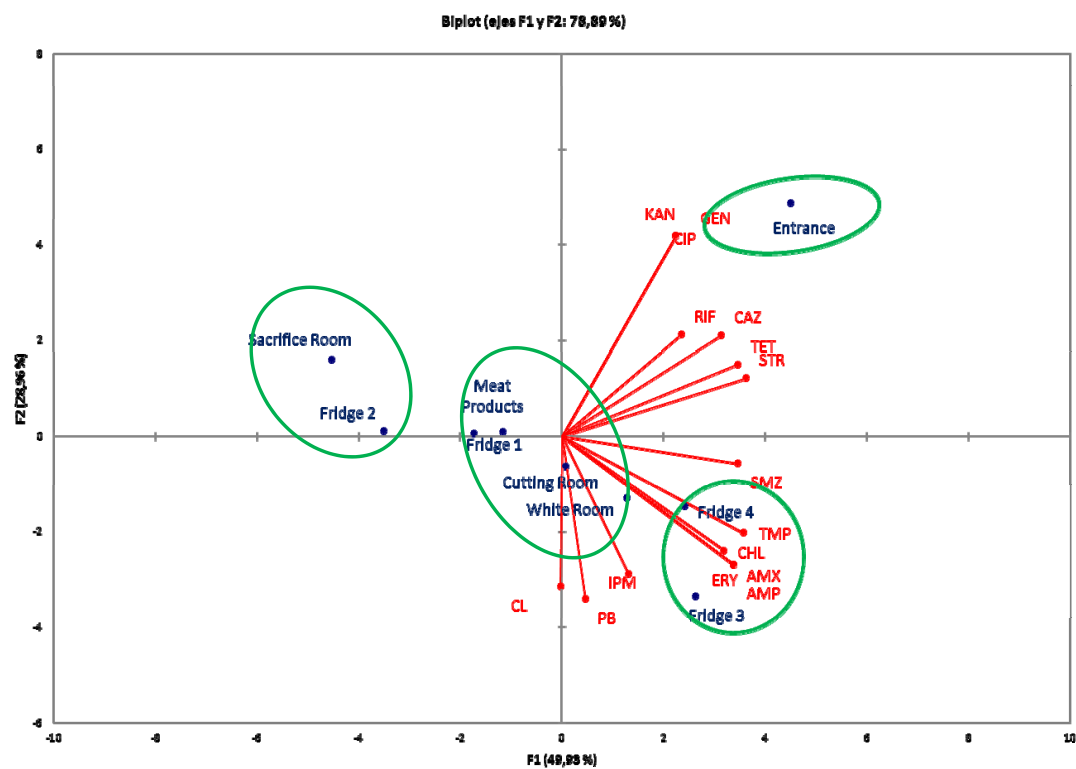
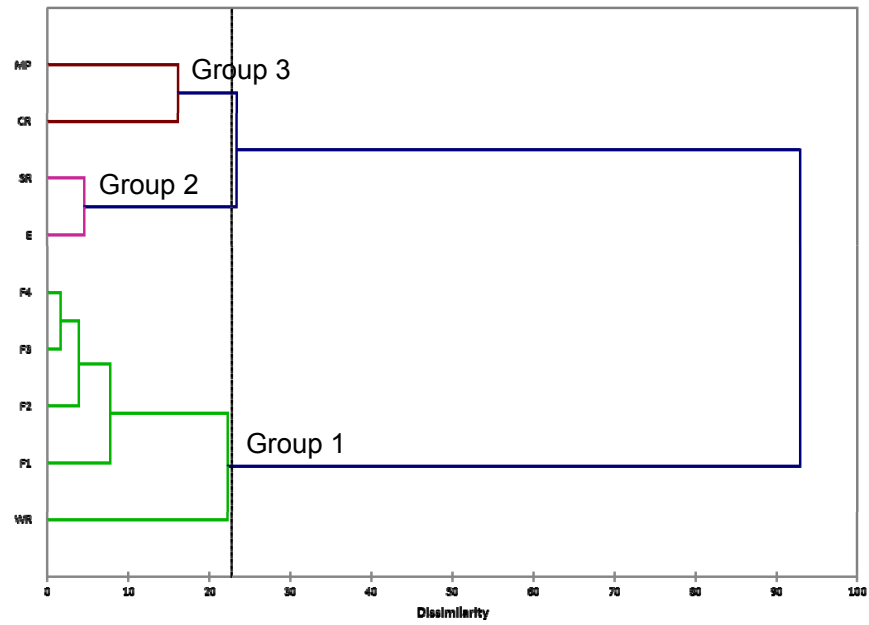


Figure 3

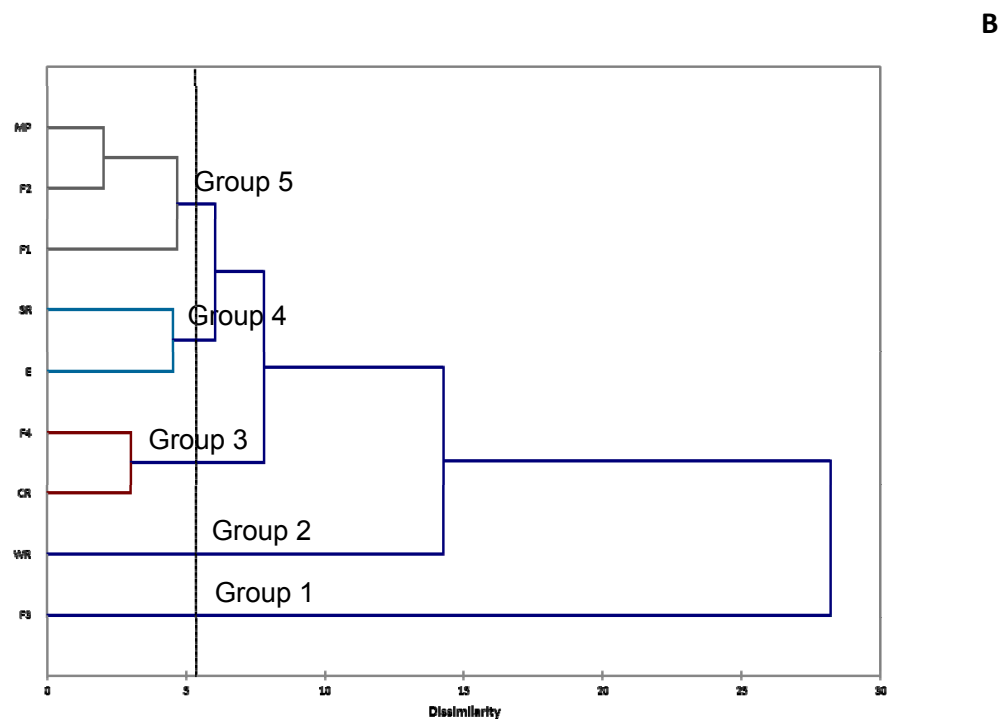
Lavilla Lerma et al.

B



A





**Figure 4**

Lavilla Lerma et al.

**Table 1**

MIC distribution of 16 antibiotics for mesophilic pseudomonads isolated throughout meat chain production.

Antibiotic	Species	No. of isolates with the following MIC range (µg/ml)										MIC breakpoint (µg/ml)	Number of resistant strains
		≥1-<2	≥2-<4	≥4-<8	≥8-<16	≥16-<32	≥32-<64	≥64-<128	≥128-<256	≥256-<512	≥512		
Amoxicillin	<i>P. putida</i>				1	2	1	1		1	7	≥32 <sup>a</sup>	2
	<i>P. lundensis</i>		4		1	1	11	1		4	2		24
	<i>P. fluorescens</i>					1					2		2
	<i>P. alkylphenolia</i>						1				1		2
Ampicillin	<i>P. putida</i>				1	1	1			1	9	≥32 <sup>a</sup>	2
	<i>P. lundensis</i>		4				9	1	1	4	1		25
	<i>P. fluorescens</i>						1			1	1		3
	<i>P. alkylphenolia</i>									1	1		2
Ceftazidime	<i>P. putida</i>						1				1	≥32 <sup>b</sup>	2
	<i>P. lundensis</i>		2		2	5	2	4		2	14		22
	<i>P. fluorescens</i>					1		1			1		2
	<i>P. alkylphenolia</i>					2							0
Imipenem	<i>P. putida</i>	1	1									≥16 <sup>b</sup>	0
	<i>P. lundensis</i>	10	7	9	4	1							1
	<i>P. fluorescens</i>	1	1			1							1
	<i>P. alkylphenolia</i>	2											0
Gentamycin	<i>P. putida</i>			2								≥16 <sup>b</sup>	0
	<i>P. lundensis</i>		7	10	8	2		1	3				6
	<i>P. fluorescens</i>		2	1									0
	<i>P. alkylphenolia</i>		2										0
Kanamycin	<i>P. putida</i>			1	1							≥64 <sup>a</sup>	0
	<i>P. lundensis</i>		11	0	6	8	2	3	1				4
	<i>P. fluorescens</i>			1	2								0
	<i>P. alkylphenolia</i>			2									0
Streptomycin	<i>P. putida</i>					1	1					≥64 <sup>a</sup>	0
	<i>P. lundensis</i>		1	1	4	12	5	2	4		2		8
	<i>P. fluorescens</i>		2			1							0
	<i>P. alkylphenolia</i>					1		1					1
Rifampicin	<i>P. putida</i>							2				≥32 <sup>d</sup>	2
	<i>P. lundensis</i>		2	1		3	16	5	3	1			25
	<i>P. fluorescens</i>						2	1					3
	<i>P. alkylphenolia</i>						2						2
Sulfamethoxazole	<i>P. putida</i>										2	≥512 <sup>b</sup>	2

	<i>P. lundensis</i>								<b>31</b>		31
	<i>P. fluorescens</i>								<b>3</b>		3
	<i>P. alkylphenolia</i>								<b>2</b>		2
Trimethoprim	<i>P. putida</i>		1						<b>1</b>	$\geq 16^a$	1
	<i>P. lundensis</i>		2	7		1	1	2	<b>1</b>	<b>17</b>	22
	<i>P. fluorescens</i>								<b>2</b>	<b>1</b>	3
	<i>P. alkylphenolia</i>								<b>2</b>	<b>2</b>	2
Colistin	<i>P. putida</i>	1	1							$\geq 8^b$	0
	<i>P. lundensis</i>	7	4	<b>2</b>	1	1	4	1		<b>11</b>	20
	<i>P. fluorescens</i>	1	1	<b>1</b>							1
	<i>P. alkylphenolia</i>	1	1								0
Polymixin B	<i>P. putida</i>	1	1							$\geq 8^b$	0
	<i>P. lundensis</i>	10	6	<b>1</b>					<b>1</b>	<b>13</b>	15
	<i>P. fluorescens</i>	2	1								0
	<i>P. alkylphenolia</i>	2									0
Erythromycin	<i>P. putida</i>								<b>2</b>	$\geq 4^c$	2
	<i>P. lundensis</i>	4			1		1	9	<b>9</b>	<b>7</b>	27
	<i>P. fluorescens</i>						1		<b>2</b>		3
	<i>P. alkylphenolia</i>									<b>2</b>	2
Chloramphenicol	<i>P. putida</i>								<b>2</b>	$\geq 32^b$	2
	<i>P. lundensis</i>		3		8	<b>9</b>		5	<b>1</b>	<b>5</b>	20
	<i>P. fluorescens</i>				1	<b>1</b>		<b>1</b>			2
	<i>P. alkylphenolia</i>								<b>1</b>	<b>1</b>	2
Ciprofloxacin	<i>P. putida</i>	2								$\geq 4^b$	0
	<i>P. lundensis</i>	29	<b>1</b>	<b>1</b>							2
	<i>P. fluorescens</i>	3									0
	<i>P. alkylphenolia</i>	2									0
Tetracycline	<i>P. putida</i>			2						$\geq 16^b$	0
	<i>P. lundensis</i>	10	3	7	<b>6</b>		1	2	<b>1</b>	<b>1</b>	11
	<i>P. fluorescens</i>	1	1	1							0
	<i>P. alkylphenolia</i>				<b>2</b>						2

The microbiological breakpoint values according to CLSI (39)<sup>b</sup>, Bruchmann et al. (40)<sup>c</sup> and Tribuddharat and Fennewald (41)<sup>d</sup> for *Pseudomonas* sp. are given. In the case of non-described antibiotics we consider the breakpoint values suggested by CLSI (2012)<sup>a</sup> for *E. coli*. Resistant strains with a MIC value higher than the breakpoints described in the table are indicated in bold.

ND: not determined.

**Table 2**

MIC distribution of 18 antibiotics for psychrotrophic pseudomonads isolated throughout meat chain production.

Antibiotic	Species	No. of isolates with the following MIC range (µg/ml)									MIC breakpoint (µg/ml)	Number of resistant strains
		≥1-<2	≥2-<4	≥4-<8	≥8-<16	≥16-<32	≥32-<64	≥64-<128	≥128-<256	≥256-<512	≥ 512	
Amoxicillin	<i>P. fragi</i>						1	1	2		≥32 <sup>a</sup>	4
	<i>P. putida</i>							2	2	1	2	7
	<i>P. lundensis</i>							3				3
Ampicillin	<i>P. fragi</i>								2	2	≥32 <sup>a</sup>	4
	<i>P. putida</i>						1			4	2	7
	<i>P. lundensis</i>								2	1		3
Ceftazidime	<i>P. fragi</i>			3			1				≥32 <sup>b</sup>	1
	<i>P. putida</i>			2	1	1		2			1	3
	<i>P. lundensis</i>			3								0
Imipenem	<i>P. fragi</i>		3			1					≥16 <sup>b</sup>	1
	<i>P. putida</i>	4	2			1						1
	<i>P. lundensis</i>	3										0
Gentamycin	<i>P. fragi</i>		2	1	1						≥16 <sup>b</sup>	0
	<i>P. putida</i>		4	1	1	1						1
	<i>P. lundensis</i>		3									0
Kanamycin	<i>P. fragi</i>		2		1						≥64 <sup>a</sup>	0
	<i>P. putida</i>		3		2	1		1				1
	<i>P. lundensis</i>		3									0
Streptomycin	<i>P. fragi</i>						3				≥64 <sup>a</sup>	1
	<i>P. putida</i>		1	1	2	1	1		1			1
	<i>P. lundensis</i>			1			2					0
Rifampicin	<i>P. fragi</i>					3	1				≥32 <sup>d</sup>	1
	<i>P. putida</i>				1	3	1	1	1			3
	<i>P. lundensis</i>					3						0
Sulfamethoxazole	<i>P. fragi</i>						2				≥512 <sup>b</sup>	2

	<i>P. putida</i>	2							5		5
	<i>P. lundensis</i>				1				2		2
Trimethoprim	<i>P. fragi</i>			1	1			1	1	$\geq 16^a$	3
	<i>P. putida</i>		1	1					5		5
	<i>P. lundensis</i>								3		3
Colistin	<i>P. fragi</i>	1	2	1						$\geq 8^b$	1
	<i>P. putida</i>	1	3			1	1		1		3
	<i>P. lundensis</i>	1		1	1						2
Polymixin B	<i>P. fragi</i>		3	1						$\geq 8^b$	1
	<i>P. putida</i>	1	4			1			1		2
	<i>P. lundensis</i>	2			1						1
Erythromycin	<i>P. fragi</i>						3	1		$\geq 4^c$	4
	<i>P. putida</i>					1		2	1	3	7
	<i>P. lundensis</i>						1		1	1	3
Chloramphenicol	<i>P. fragi</i>					2			2	$\geq 32^b$	4
	<i>P. putida</i>				2				1	4	5
	<i>P. lundensis</i>								1	2	3
Ciprofloxacin	<i>P. fragi</i>	4								$\geq 4^b$	0
	<i>P. putida</i>	7									0
	<i>P. lundensis</i>	3									0
Tetracycline	<i>P. fragi</i>		3				1			$\geq 16^b$	1
	<i>P. putida</i>		1	3	3						3
	<i>P. lundensis</i>		1		2						2

The microbiological breakpoint values according to CLSI (39)<sup>b</sup>, Bruchmann et al. (40)<sup>c</sup> and Tribuddharat and Fennewald (41)<sup>d</sup> for *Pseudomonas* sp. are given. In the case of non-described antibiotics we consider the breakpoint values suggested by CLSI (2012)<sup>a</sup> for *E. coli*. Resistant strains with a MIC value higher than the breakpoints described in the table are indicated in bold.

ND: not determined.

## **APORTACIÓN 2**

**Leyre Lavilla Lerma, Nabil Benomar, Antonio Gálvez, and Hikmate Abriouel. Correlation between antibiotic and biocide resistance in mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* sp. isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production. En preparación.**



**Correlation between antibiotic and biocide resistance in mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* sp. isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production**

**Leyre Lavilla Lerma, Nabil Benomar, Antonio Gálvez, and Hikmate Abriouel\***

*Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, 23071-Jaén, Spain.*

*\*Corresponding author. Present address: Área de Microbiología. Departamento de Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales. Edif. B3. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas s/n. 23071-Jaén, Spain. Tel.: 34-953-212003; fax: 34-953-212943.*

E-mail address: hikmate@ujaen.es

## **Abstract**

The aim of this study was to evaluate biocide susceptibility in mesophilic and psychrotrophic pseudomonads isolated from surfaces of a goat and lamb slaughterhouse, which was representative of the region. To determine biocide resistance in pseudomonads, we determined for the first time the ECOFFs of benzalkonium, cetrimide, chlorhexidine, hexachlorophene, P3 oxonia, PHMG, topaxx 66 and triclosan being generally very similar in different *Pseudomonas* spp. with some exceptions. Thus, resistance of pseudomonads was mainly shown to triclosan, and to lesser extent to cetrimide and benzalkonium chloride depending on the species, however they were highly susceptible to industrial formulation of biocides. By means of statistical analysis, positive correlations between antibiotics, biocides and both antimicrobials in pseudomonads were detected suggesting a co- or cross resistance between different antimicrobials in goat and lamb slaughterhouse environment and animals. Cross-resistance between biocides and antibiotics in pseudomonads were especially detected between PHMG or triclosan and different antibiotics depending on the biocide and the population type. Thus, the use of those biocides as disinfectant in slaughterhouse zones must be considered because of the selection pressure effect of biocides on antibiotic resistance which could emerge and be spread to the consumer. It is noteworthy that specific industrial formulations such as topax 66 and oxonia P3 showed few correlations with antibiotics (none or 1-2 antibiotics) which should be taken into consideration for disinfection practices in goat and lamb slaughterhouse.

## Introduction

Biocides are chemical antimicrobial agents which have been extensively used for decades for different purposes such as disinfection and preservation, with the aim to ensure safety and to avoid spread of infectious disease (De Muynck et al., 2010). However, inappropriate use and overuse of biocides in different areas such as hospitals, food industries, homes and also in several products (toothpastes, pesticides among others) lead to the emergence of tolerance/resistance to various biocides (triclosan, quaternary ammonium compounds, chlorhexidine and trisodium phosphate) (Brauodaki et al., 2005; Romanova et al., 2002; Yuk et al., 2006.....) and the concomitant resistance to antibiotics (McBain et al., 2002). The selective pressure exerted by biocides was responsible of cross-resistance between antibiotics and biocides (Davin-Regli and Pagès, 2012) since the discharge of low concentration of biocides to the environment may increase the risk of selection of resistant microorganisms and maintain selective pressure. With the aim to preserve the activity of biocides and to avoid the emergence of tolerance/resistance to both antimicrobials, prudent use of biocides should be concerned not only in clinical settings but also in veterinary, agricultural, industrial and other applications. In fact, several regulatory schemes were developed to control biocide use in different areas (EU, Regulation 528/2012) covering different products including disinfectants, pest control products and preservatives.

Definition of biocide resistance similar to antibiotics (Kahlmeter et al., 2003) still remains unclear since no breakpoints have been established by international organizations (Eucast, CLSI), and tolerance is used rather than resistance. Recently, Morrissey et al. (2014) determined ECOFFs for biocides in different pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Enterococcus faecium* and *E. faecalis*, however no studies were done with *Pseudomonas* species. Pseudomonads are Gram-negative aerobic bacteria widely distributed in the environment (soil and water); they are opportunistic pathogens and highly resistant to physico-chemical conditions and antimicrobials due to their metabolic versatility, plasticity of their genome and their ability to acquire antibiotic resistance mechanisms (Livermore, 2002; Palleroni, 2010; Vaz-Moreira et al., 2012). Considering these characteristics, *Pseudomonas* sp. may pose some public health concerns.

In slaughterhouse environment, the risks are mainly associated with the concentration of biocide used rather than its presence, since shift in concentration could be crucial in bacterial adaptation and selection of tolerant/resistant strains. Furthermore, the large quantities of effluents containing biocides generated during slaughtering and meat processing (cleaning equipment) could have a great impact on the spread of resistances in the environment (SCENIHR, 2009, 2010). In goat and lamb slaughterhouse, antibiotic/biocide resistant *Pseudomonas* species were isolated from all surfaces throughout meat chain production and also in the end products being highly prevalent in cutting room (CR), fridge (F3) and meat products (MP) (Lavilla Lerma et al., 2013). These data indicated that *Pseudomonas* sp. was able to persist and withstand hygienic and sanitizing treatments applied in slaughterhouse surfaces which agreed with the data obtained by de Oliveira et al. (2013). The present study was undertaken to categorize *Pseudomonas* species isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production as susceptible or resistant to biocides by evaluation of MIC distribution of various biocides and determination of their ECOFFs. To our knowledge, this is the first report describing ECOFFs of biocides in *Pseudomonas* sp. as tool of resistance surveillance in this genus. Also, we investigated by means of statistical analysis the relationship between biocide and antibiotic resistances in *Pseudomonas* sp.

## **2. Material and Methods**

**2.1. Bacterial strains and culture conditions.** A total of 52 psychrotrophic and mesophilic isolates of *Pseudomonas* sp. (9 *P. putida*, 34 *P. lundensis*, 4 *P. fragi*, 2 *P. alkylphenolia* and 3 *P. fluorescens*) (Lavilla Lerma et al., submitted for publication) resistant to biocides and/or antibiotics were used in the present study. The strains were obtained from different surfaces (entrance, sacrifice-room, cold-room, cutting-room, freezing-tunnel and white-room) of a lamb slaughterhouse in Jaén (Spain) and also from five meat products from different shops in Jaén as described previously by Lavilla Lerma et al. (2013). All strains were maintained and stored in tryptone-soya-broth (TSB; Scharlab, Barcelona, Spain) containing 20% glycerol at – 80°C. For routine use, all pseudomonads were cultivated on TSB at 22°C for 24-48 h.

**2.2. Antimicrobial agents.** The antimicrobial agents listed in Tables 1 and 2 were used in this study and included various biocides used in food industry. Benzalkonium chloride (BC), Cetrimide (CE), Chlorhexidine dihydrochloride (CH), Hexachlorophene [2,20-methylenebis(3,4,6-trichlorophenol)] (CF), Oxonia 3P (OIP3), PHMG, Topax 66 (T66) and Triclosan (TC) were used in this study. All biocides were purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain) except Triclosan which was obtained from Fluka (Madrid, Spain).

**2.3. Antimicrobial susceptibility testing.** The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the above mentioned biocides was measured in a concentration range from 0.0025 mg/L to 10 mg/L. MIC of all antimicrobials was determined using the NCCLS broth microdilution method (NCCLS, 2000). After incubation, the MIC was read as the lowest concentration of each antimicrobial agent that inhibited the visible growth of the strain. All the MIC determinations of each antimicrobial for each strain were carried out in triplicate, and the reliable results were taken if at least two out of three replicates were in agreement.

### **2.4. Determination of ECOFFs**

ECOFF is defined, in a given bacterial species showing unimodal MIC distribution for a given antimicrobial, as concentration representing  $\geq 95\%$  (MIC<sub>95</sub>) of the bacterial population (Pfaller et al., 2010). In this case, isolates which have MIC inside the normal distribution are considered as wild-type; strains above this value are considered as

resistant strains (Morrissey *et al.*, 2009). On the other hand, when bimodal MIC distribution is shown, the ECOFF was set between the two populations (Morrissey *et al.*, 2009). In the first case, SPSS was used to normalise the data (Kolmogorov-Smirnov test), and MICs were ln-transformed.

**2.5. Statistical analysis.** To investigate the degree of cross-resistance between different antimicrobials (antibiotics and/or biocides), Pearson correlation coefficients ( $r$ ) were calculated for the correlation between MICs of two antimicrobials by means of a computed statistical algorithm using SPSS Windows Base System (version 6.0; SPSS Inc, Chicago, IL). Pearson correlation determines the extent to which values of two variables (MIC of two antimicrobials) are linearly related. Pearson correlation coefficient ( $r$ ) is high (positive value) when a linear relationship between MICs of both antimicrobials occurred, however  $r$  is low (negative value) when the MIC of both antimicrobials are inverted. Categorization of correlations between different antimicrobials was done as mentioned by Dancey and Reidy (2004), being the strength of correlation strong when the correlation coefficient is in the range 0,7-0,9, moderate 0,4-0,6 and weak 0,1-0,3. In all analyses, a  $P$  value of  $<0.05$  was considered significant.

### 3. RESULTS

**3.1. Biocide susceptibility assays and ECOFFs determination.** MIC distribution of the different biocides in all pseudomonads isolated from slaughterhouse surfaces and end products was shown in Figure 1. The results obtained showed that higher percentage of isolates with MIC equal or higher than 10 mg/L was only obtained with triclosan in all pseudomonads (Fig. 1), especially in *P. putida* (55%) and 35% of *P. lundensis* (Fig. 1A and B). In general, high MICs ranged from 2.5-5 mg/L were shown for topax 66 in all pseudomonads regardless the species identity (Fig. 1).

The MIC ECOFF of different biocides was determined for each *Pseudomonas* species as the upper limit of the normal MICs distribution for a given biocide being compassed at least 95% of isolates (Turnidge and Paterson, 2007) (Figure 2, Table 1). The ECOFFs of chlorhexidine (0.025 mg/L), hexachlorophene (0.25 mg/L), PHMG (0.25 mg/L) and topax 66 (5 mg/L) were identical in all *Pseudomonas* species studied, however *P. lundensis* exhibited a higher ECOFF than other species for P3 oxonia and triclosan (2.5 and 5 mg/L, respectively) (Table 1). Regarding benzalkonium chloride and cetrimide (ECOFF of 0.25 and 2.5 mg/L), two groups were detected exhibiting each group the same ECOFF, one formed by *P. putida* and *P. lundensis* and the other one of *P. fluorescens*, *P. alkylphenolia* and *P. fragi* (Table 1).

Pseudomonads were considered resistant to biocides when strains presented a MIC above the previously established ECOFF. Thus, resistance was generally detected in all mesophilic and psychrotrophic pseudomonads to triclosan (25-100%) followed by benzalkonium chloride in mesophilic *P. fluorescens* and *P. alkylphenolia* (67-100%, Fig. 3). Furthermore, mesophilic *P. lundensis* showed resistance to cetrimide (29%) and chlorhexidine (3%). However, pseudomonads were very susceptible to hexachlorophene, P3 oxonia, PHMG and topax 66 (Table 1).

### 3.2. Correlation between antimicrobials and MICs in mesophilic *Pseudomonas* sp.

The strength of any linear relationship between MICs of two antimicrobials (antibiotics and/or biocides) was determined in this study. Pearson's correlation coefficient analysis between all antimicrobials showed a strong correlation between antibiotics (all classes), biocides and also between both antimicrobials in *Pseudomonas* sp. strains (Table 2). All antibiotics were significantly correlated with at least one other antibiotic and one biocide except for ciprofloxacin with other antibiotics; chloramphenicol and rifampicin which were not correlated with biocides; and in the case of chlorhexidine no

correlations with antibiotics neither biocides were detected (Table 2). Strong positive correlations were observed between both penicilins (amoxicillin and ampicillin;  $r = 0.984$ ), and also between both lipopeptides (colistin and polymixin B;  $r = 0.755$ ). Concerning moderate correlation, those were obtained with polymixin B and tetracycline ( $r = 0.676$ ); gentamicin and streptomycin ( $r = 0.639$ ); hexachlorophene and topax 66 ( $r = 0.619$ ); PHMG and colistin ( $r = 0.594$ ) or polymixin B ( $r = 0.581$ ); cetrimide and colistin ( $r = 0.570$ ) or oxonia 3 ( $r = 0.568$ ); kanamycin and polymixin B ( $r = 0.556$ ); imipenem and amoxicillin or ampicillin ( $r = 0.527$ - $0.540$ ); erythromycin and chloramphenicol or trimethoprim ( $r = 0.527$ - $0.523$ ); amoxicillin or ampicillin with benzalkonium chloride ( $r = 0.489$  or  $0.518$ , respectively); topax 66 and triclosan ( $r = 0.492$ ); triclosan and trimethoprim ( $r = 0.464$ ) or amoxicillin ( $r = 0.441$ ); ceftazidime or colistin with oxonia P3 and PHMG ( $r = 0.461$ - $0.467$  and  $r = 0.451$ - $0.594$ , respectively), gentamicin and kanamycin or polymixin B ( $r = 0.455$ - $0.463$ ), gentamicin and PHMG ( $r = 0.426$ ), ampicillin with trimethoprim ( $r = 0.437$ ), polymixin B and cetrimide ( $r = 0.428$ ), erythromycin and topax 66 ( $r = 0.420$ ). Regarding the rest of correlations, they were weak.

MICs of all antimicrobials were correlated also negatively in mesophilic *Pseudomonas* sp. strains, in this way higher correlations were only observed for sulfametoxazol and kanamycin ( $r = -0.742$ ). Moderate correlations were obtained between kanamycin and hexachlorophene ( $r = -0.628$ ) or topax 66 ( $r = -0.475$ ); gentamicin and sulfametoxazol ( $r = -0.537$ ), hexachlorophene ( $r = 0.437$ ) or topax 66 ( $r = -0.463$ ); polymixin B and sulfamethoxazol ( $r = -0.484$ ) or hexachlorophene ( $r = -0.509$ ); hexachlorophene and PHMG ( $r = -0.508$ ), colistin ( $r = -0.451$ ) or ciprofloxacin ( $r = -0.402$ ); ciprofloxacin and topax 66 ( $r = -0.448$ ) or hexachlorophene ( $r = -0.402$ ).

**3.3. Correlation between antimicrobials and MICs in psychrotrophic *Pseudomonas* sp.** Psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strains showed different behaviour comparing with mesophilic strains (Table 3). Strong positive correlations were obtained with both lipopeptides: colistin and polymixin B ( $r = 1$ , perfect correlation); ceftazidime and colistin or polymixin B ( $r = 0.996$ - $0.997$ ); ampicillin and rifampicin ( $r = 0.945$ ); gentamicin and kanamycin ( $r = 0.932$ ); imipenem and tetracycline ( $r = 0.922$ ) or PHMG ( $r = 0.792$ ); amoxicillin and ampicillin ( $r = 0.835$ ) or rifampicin ( $r = 0.822$ ); PHMG and tetracycline ( $r = 0.726$ ); amoxicillin and kanamycin ( $r = 0.704$ ); triclosan and chlorhexidine ( $r = 0.708$ ). However, moderate correlations were shown between



amoxicillin and chlorhexidine or triclosan ( $r = 0.672$ ); erythromycin and topax 66 ( $r = 0.640$ ); amoxicillin and gentamicin ( $r = 0.627$ ); PHMG and kanamycin ( $r = 0.626$ ); trimethoprim and erythromycin ( $r = 0.608$ ); chloramphenicol and sulfamethoxazol ( $r = 0.602$ ); chlorhexidine and gentamicin ( $r = 0.588$ ); gentamicin and triclosan ( $r = 0.588$ ); benzalkonium chloride and topax 66 ( $r = 0.577$ ); sulfamethoxazol and erythromycin ( $r = 0.575$ ).

Concerning negative correlations between MICs of different antimicrobials, only hexachlorophene and polymixin B ( $r = -0.679$ ), colistin ( $r = -0.678$ ) or ceftazidime ( $r = -0.667$ ) showed this type of correlation.

## Discussion

There are growing concerns about the role of biocides in the selection and spread of antibiotic resistance, thus several studies were focused on biocide susceptibility (MIC determination and distribution) in clinically relevant bacteria (Aiello and Larson, 2003; Levy, 2001; Meyer and Cookson, 2010). However, distinction between wild type and resistant organism was not established until recently for some biocides in *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* (Morrissey et al., 2014). Currently there are no studies concerned pseudomonads, thus in the present study our motivation was to fill the gap in the literature about the ECOFFs of biocides in *Pseudomonas* species and also to evaluate this resistance in antibiotic multiresistant strains (Lavilla Lerma et al., 2014) isolated from goat and lamb slaughterhouse throughout meat chain production including end products. In general, the ECOFFs of all biocides determined here for *Pseudomonas* species were lower than those determined for other bacteria such as *Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus* and *E. faecalis* among others (Morrissey et al., 2014) except for triclosan in *P. lundensis*. The lower ECOFF of biocides determined in pseudomonads maybe due to the differences in cell structure between different bacteria and even between species of the same genus since biocides target several bacterial cell structures (Russell, 2003). It is noteworthy that any of the pseudomonads from lamb and goat slaughterhouse was resistant to the industrial biocides tested in this study which comprised specific formulations such as topax 66 and P3-oxonia. Those industrial formulations contained sodium hydroxide, sodium hypochlorite, hydrogen peroxide, acetic acid among others as active biocidal agents, targeting the bacterial cell at several levels and could explain the absence of resistant strains.

Biocide resistance was largely reported especially to triclosan which is the most used biocide in different areas (clinical, industry and veterinary). Such increased resistance or tolerance is due to the overuse and selective pressure which allowed the presence of mobile genetic elements harboring specific genes involved in the resistance to biocides and antibiotics.

The role of biocides in the increased bacterial resistance to antibiotics is concerned since several changes in European legislation and claims of a risk of biocide use were promoted. In the present study, we analyzed statistically the possible interconnections

between biocides (commonly used in food industry) and antibiotics (frequently used in clinical treatments), such relationship was largely reported and often involved the up-regulation of efflux pumps (Buffet-Bataillon et al., 2012; Frimodt-Møller and Kolmos, 2011). In this study, positive correlations were detected between antibiotics, biocides and the combination of both antimicrobials which was highly dependent on the population type of pseudomonads (mesophiles showed multiple correlations). Antibiotics of the same class which shared the same resistance mechanism targeting a determined cellular structure such as cell wall synthesis for beta-lactams (amoxicillin, ampicillin, ceftazidime and imipenem), cytoplasmic membrane for lipopeptides (polymixin B and colistin), protein synthesis via 30S ribosomal subunit inhibition for aminoglycosides (gentamicin, kanamycin and streptomycin) and tetracycline or by inhibition of the 50S ribosomal subunit for erythromycin and chloramphenicol exhibited a strong-moderate correlation suggesting that decreased susceptibility to a given antibiotic may precede or even predict decreased susceptibility to the other(s) antibiotic(s) of the same class in lamb and goat slaughterhouse environment. Furthermore, antibiotics belonging to different classes targeting different cellular structures also showed positive correlations such as polymixin B and tetracycline (mesophilic pseudomonads), lipopeptides and different antibiotics (gentamycin, imipenem, tetracycline and trimethoprim or ceftazidime for mesophilic and psychrotrophic pseudomonads, respectively), imipenem and tetracycline (psychrotrophs), trimethoprim and erythromycin among others. In this case, positive correlations maybe due to co-resistance being unrelated resistance mechanisms carried by the same mobile genetic element (plasmid, transposon or integron) or cross-resistance which especially relies on unspecific resistance mechanisms with a wide range of activity against antibiotics such as efflux pumps. In this way, recent study carried out by Lavilla Lerma et al. (2014) showed the presence of class 1 and 2 integrons in some pseudomonads throughout meat chain production in lamb and goat slaughterhouse. It is noteworthy to point out that some unrelated antibiotics may select resistance for the other (Summers, 2002) and previous knowledge about this in slaughterhouse is of great interest since adequate antibiotic treatments should be chosen considering those data.

Concerning biocides which targeted several cellular structures by unspecific interactions except for triclosan (inhibition of the enoyl-reductase), they also showed positive correlations especially in mesophilic pseudomonads. Positive correlations were

detected in mesophilic pseudomonads between topax 66, triclosan, benzalkonium chloride or oxonia P3; cetrimide and PHMG, benzalkonium chloride or oxonia P3; and also between hexachlorophene and benzalkonium chloride. However, psychrotrophic pseudomonads showed positive correlations only in the case of triclosan and chlorhexidine, and topax 66 and benzalkonium chloride.

Cross-resistance between biocides and antibiotics which relies mainly on efflux pumps were especially detected between PHMG or triclosan and different antibiotics depending on the biocide and the population type. Thus, the use of those biocides as disinfectant in slaughterhouse zones must be considered and re-evaluated because of the selection pressure effect of antibiotics on resistance which could emerge and be spread to the consumer. It is noteworthy that specific industrial formulations such as topax 66 and oxonia P3 showed few correlations with antibiotics (none or 1-2 antibiotics) which should be taken into consideration for disinfection practices in in goat and lamb slaughterhouse. Furthermore, the observation of negative correlations between antibiotics and biocides may be a useful reason for the continued use of some biocides promoting hygiene in slaughterhouse environment.

## **Acknowledgments**

This work was supported by grants AGL2009-08921, P08-AGR-4295, Plan propio de la Universidad de Jaén, and Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario CeIA3. Leyre Lavilla Lerma was beneficiary of a fellowship from Spanish Ministry of Education and Science.

## References

- Aiello, A.E., Larson, E., 2003. Antibacterial cleaning and hygiene products as an emerging risk factor for antibiotic resistance in the community. *Lancet Infect. Dis.* 3, 501–506.
- Brauodaki, M., Hilton, A.C., 2005. Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan, *Int. J. Antimicrob. Agents* 25, 31–37.
- Buffet-Bataillon, S., Le Jeune, A., Le Gall-David, S., Bonnaure-Mallet, M., Jolivet-Gougeon, A., 2012. Molecular mechanisms of higher MICs of antibiotics and quaternary ammonium compounds for *Escherichia coli* isolated from bacteraemia. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2837–2842.
- Davin-Regli, A., Pagès, J.M., 2012. Cross-resistance between biocides and antimicrobials: an emerging question. *Rev. Sci. Tech.* 31, 89–104.
- De Muynck, W., De Belie, N., Verstraete, W., 2010. Antimicrobial mortar surfaces for the improvement of hygienic conditions. *J. Appl. Microbiol.* 108, 62–72.
- De Oliveira, K.M.P., Pericles, D.D.S., GRISOLIA, A.B., 2013. Antimicrobial susceptibility profile of *Pseudomonas* spp. isolated from a swine slaughterhouse in Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Rev. Argent. Microbiol.* 45, 57–60.
- Kahlmeter, G., Brown, D.F., Goldstein, F.W., MacGowan, A.P., Mouton, J.W., et al. 2003. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 145–148.
- Levy, S.B., 2001. Antibacterial household products: cause for concern. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 512–515.
- McBain, A.J., Rickard, A.H., Gilbert, P., 2002. Possible implications of biocide accumulation in the environment on the prevalence of bacterial antibiotic resistance. *J. Ind. Microbiol.* 29, 326–330.
- Meyer, B., Cookson, B., 2010. Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control?. *J. Hosp. Infect.* 76, 200–205.
- Romanova, N., Favrin, S., Griffiths, M.W., 2002. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizers used in the meat processing industry. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6405–6409.
- Pfaller, M.A., Andes, D., Diekema, D.J., Espinel-Ingroff, A., Sheehan, D., The CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing. 2010. Wild-type MIC

- distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist. Updates* 13, 180–195.
- Russell, A.D., 2003. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 750–763.
- SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), 2009. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. Brussels, Belgium: European Commission. pp. 1–87.
- SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), 2010. Research Strategy to Address the Knowledge Gaps on the Antimicrobial Resistance Effects of Biocides. Brussels, Belgium: European Commission. pp. 1–34.
- Summers, A.O., 2002. Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. *Clin. Infect. Dis.* 34, S85–S92.
- Turnidge, J., Paterson, D.L., 2007. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 391–408.
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C., Manaia, C.M., 2012. Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Sci. Total Environ.* 426, 366–74.
- Yuk, H.G., Marshall, D.L., 2006. Effect of trisodium phosphate adaptation on changes in membrane lipid composition, verotoxin secretion, and acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastric fluid. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 39–44.

## Figure legends.

**Figure 1.** MIC distribution of biocides in mesophilic and psychrotrophic pseudomonads (A, *P. putida*; B, *P. lundensis*; C, *P. alkylphenolia*, *P. fragi* and *P. fluorescens*) isolated from slaughterhouse surfaces throughout the chain of meat production and from the end products.

**Figure 2.** Populational susceptibility of *Pseudomonas* spp. to biocides and determination of ECOFFs.

**Figure 3.** Heat-map summary of phenotypic biocide resistance in mesophilic (A) and psychrotrophic (B) pseudomonads isolated from slaughterhouse surfaces throughout the chain of meat production and from the end products. The level of resistance is indicated by the scale described above the graph (R, resistant, S, susceptible; E, ECOFF). BC, benzalkonium chloride; CE, Cetrimide; CH, Chlorhexidine; CF, Hexachlorophene; OIP3, Oxonia 3P; PHMG; T66, Topax 66; TC, Triclosan.

**Table 1**

MIC distribution of 8 biocides for pseudomonads isolated throughout meat chain production.

Biocide	Species	MIC breakpoint (mg/L)							ECOFF	Number of resistant strains
		≤0.0025	>0.0025-≤0.025	>0.025 ≤0.25	>0.25 ≤2.5	>2.5 ≤5	>5 ≤10	>10		
Benzalkonium	<i>P. putida</i>		2	6	1				2.5	0
	<i>P. lundensis</i>	2	10	12	10				2.5	0
	<i>P. fluorescens</i>			1	2				0.25	2
	<i>P. alkylphenolia</i>				2				0.25	2
	<i>P. fragi</i>		3	1					0.25	0
Cetrimide	<i>P. putida</i>		4	5					0.25	0
	<i>P. lundensis</i>	4	18	3	6		3		0.25	9
	<i>P. fluorescens</i>				3				2.5	0
	<i>P. alkylphenolia</i>		2						2.5	0
	<i>P. fragi</i>		1	3					2.5	0
Chlorhexidine	<i>P. putida</i>	3	6						0.025	0
	<i>P. lundensis</i>	15	18	1					0.025	1
	<i>P. fluorescens</i>	2	1						0.025	0
	<i>P. alkylphenolia</i>	1	1						0.025	0
	<i>P. fragi</i>	2	2						0.025	0
Hexachlorophene	<i>P. putida</i>		2	7					0.25	0
	<i>P. lundensis</i>	4	5	25					0.25	0
	<i>P. fluorescens</i>			3					0.25	0
	<i>P. alkylphenolia</i>			2					0.25	0
	<i>P. fragi</i>			4					0.25	0
P3 oxonia	<i>P. putida</i>		6	3					0.25	0
	<i>P. lundensis</i>		11	16	7				2.5	0
	<i>P. fluorescens</i>		2	1					0.25	0
	<i>P. alkylphenolia</i>			2					0.25	0
	<i>P. fragi</i>		3	1					0.25	0
PHMG	<i>P. putida</i>		2	7					0.25	0
	<i>P. lundensis</i>		18	16					0.25	0
	<i>P. fluorescens</i>		3						0.25	0
	<i>P. alkylphenolia</i>		1	1					0.25	0
	<i>P. fragi</i>		3	1					0.25	0
Topax 66	<i>P. putida</i>				4	5			5	0
	<i>P. lundensis</i>			5	7	22			5	0
	<i>P. fluorescens</i>				2	1			5	0



	<i>P. alkylphenolia</i>					2		5	0	
	<i>P. fragi</i>				3	1		5	0	
Triclosan	<i>P. putida</i>		2				<b>2</b>	<b>5</b>	0.25	7
	<i>P. lundensis</i>	4	14	1	1		<b>2</b>	<b>12</b>	5	14
	<i>P. fluorescens</i>		1					<b>2</b>	0.25	2
	<i>P. alkylphenolia</i>							<b>2</b>	0.25	2
	<i>P. fragi</i>		3				<b>1</b>		0.25	1

**Table 2.- Correlations between antibiotics and biocides in mesophilic pseudomonads (*log*-transformed).**

	AMP	AMX	CAZ	CIP	CHL	CL	ERY	GEN	IPM	KAN	PB	RIF	SMZ	STR	TET	TMP	BC	CE	CH	CF	OIP3	PHMG	T66	TC
AMP	1																							
AMX	<b>0.984**</b>	1																						
CAZ	0.200	0.213	1																					
CIP	-0.115	-0.108	-0.144	1																				
CHL	0.035	0.006	0.059	-0.097	1																			
CL	0.222	0.247	<b>0.331*</b>	-0.104	-0.216	1																		
ERY	0.197	0.132	0.036	-0.171	<b>0.527**</b>	-0.099	1																	
GEN	0.137	0.154	0.238	0.035	-0.156	<b>0.325*</b>	-0.222	1																
IPM	<b>0.527**</b>	<b>0.540**</b>	0.122	-0.142	-0.186	<b>0.324*</b>	-0.094	<b>0.384*</b>	1															
KAN	-0.050	-0.028	<b>0.321*</b>	0.099	-0.220	0.170	-0.263	<b>0.455**</b>	0.163	1														
PB	0.020	0.042	0.190	-0.091	-0.227	<b>0.755**</b>	-0.209	<b>0.463**</b>	<b>0.378*</b>	<b>0.556**</b>	1													
RIF	0.113	0.026	-0.227	0.223	0.098	-0.192	<b>0.329*</b>	-0.254	0.109	-0.209	-0.216	1												
SMZ	0.088	0.082	-0.089	0.034	0.071	0.028	0.097	<b>-0.537**</b>	-0.204	<b>-0.742**</b>	<b>-0.484**</b>	0.118	1											
STR	0.212	0.228	-0.032	0.308	-0.116	0.235	-0.181	<b>0.639**</b>	0.313	0.307	0.229	-0.180	-0.102	1										
TET	-0.138	-0.128	0.032	-0.004	-0.128	<b>0.366*</b>	-0.120	0.290	0.087	<b>0.392*</b>	<b>0.676**</b>	-0.127	<b>-0.395*</b>	0.177	1									
TMP	<b>0.437**</b>	<b>0.398*</b>	0.274	-0.183	0.311	<b>0.327*</b>	<b>0.523**</b>	-0.033	0.081	-0.077	0.123	0.075	0.143	0.088	0.104	1								
BC	<b>0.518**</b>	<b>0.489**</b>	0.006	-0.193	0.151	0.122	<b>0.340*</b>	-0.106	0.145	-0.251	-0.011	0.140	0.149	-0.025	0.070	<b>0.478**</b>	1							
CE	0.270	0.277	0.207	-0.107	-0.133	<b>0.570**</b>	0.057	-0.131	0.066	0.103	<b>0.428**</b>	-0.049	0.083	-0.135	<b>0.383*</b>	0.280	<b>0.474**</b>	1						
CH	-0.057	-0.039	0.058	-0.105	-0.069	0.230	0.048	-0.036	0.089	0.126	0.273	0.110	-0.012	-0.088	0.197	-0.091	-0.043	0.011	1					
CF	0.106	0.081	<b>-0.346*</b>	<b>-0.402*</b>	0.241	<b>-0.451**</b>	0.243	<b>-0.437**</b>	-0.002	<b>-0.628**</b>	<b>-0.509**</b>	0.171	0.278	-0.311	-0.192	0.014	<b>0.356*</b>	-0.042	-0.233	1				
OIP3	0.030	0.034	<b>0.461**</b>	-0.095	-0.152	<b>0.467**</b>	-0.047	-0.151	0.017	0.088	0.232	-0.064	0.105	-0.156	0.216	0.116	0.212	<b>0.568**</b>	0.052	-0.013	1			
PHMG	0.285	0.281	<b>0.451**</b>	-0.103	0.082	<b>0.594**</b>	0.256	<b>0.426**</b>	0.199	<b>0.369*</b>	<b>0.581**</b>	-0.105	-0.193	<b>0.361*</b>	<b>0.374*</b>	<b>0.487**</b>	0.278	<b>0.398*</b>	0.250	<b>-0.508**</b>	0.144	1		
T66	0.192	0.184	-0.132	<b>-0.448**</b>	0.269	0.057	<b>0.420**</b>	<b>-0.463**</b>	-0.064	<b>-0.475**</b>	-0.202	0.203	<b>0.351*</b>	<b>-0.367*</b>	-0.128	0.291	<b>0.322*</b>	0.216	0.209	<b>0.619**</b>	0.149	-0.116	1	
TC	<b>0.416**</b>	<b>0.441**</b>	0.072	-0.227	0.127	0.304	<b>0.358*</b>	-0.106	<b>0.391*</b>	-0.085	0.191	0.313	0.095	-0.078	0.102	<b>0.464**</b>	0.249	0.190	0.297	0.092	0.066	0.300	<b>0.492**</b>	1

\* Significant correlation at  $p < 0.05$  level

\*\*Significant correlation at  $p < 0.01$  level

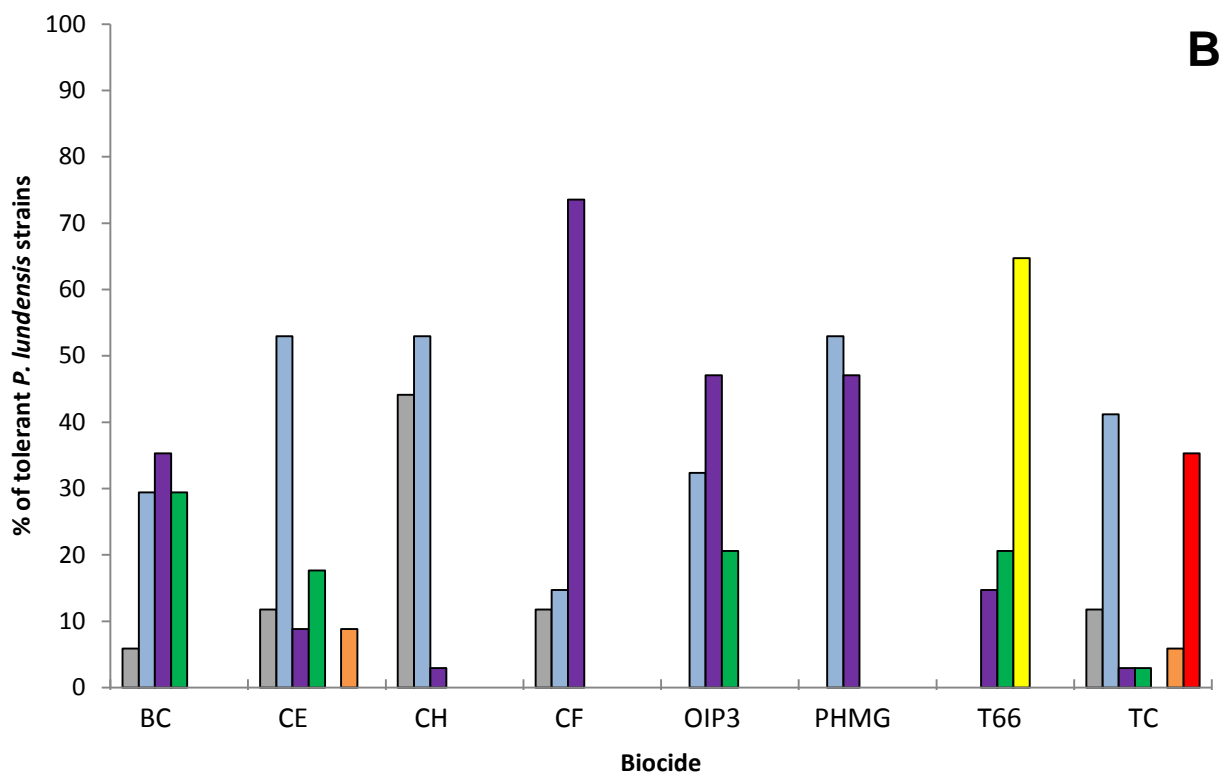
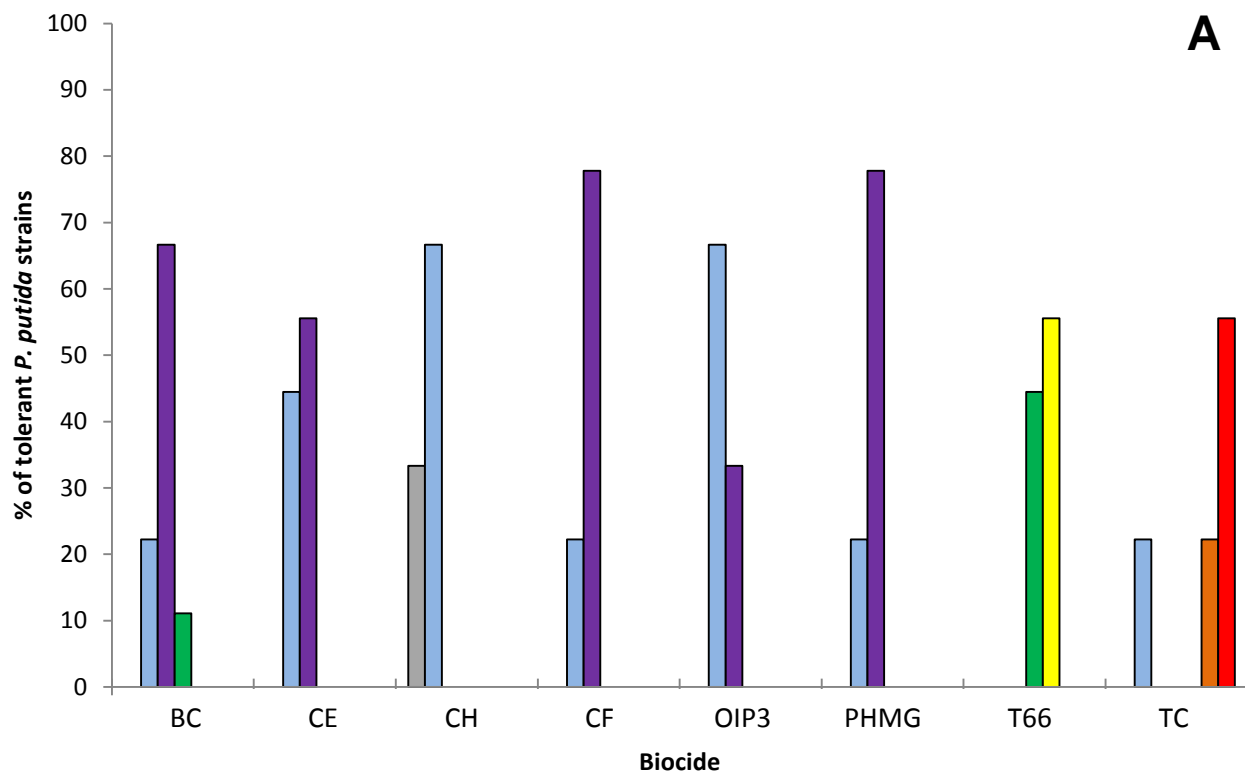
Antimicrobials are: AMP, ampicillin; AMX, amoxicillin; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; CHL, chloramphenicol; CL, colistin; ERY, erythromycin; GEN, gentamycin; IPM, imipenem; KAN, kanamycin; PB, polymixin B; RIF, rifampicin; SMZ, sulfametoazol; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TMP, trimethoprim; BC, benzalkonium chloride; CE, cetrimide; CH, chlorhexidine dihydrochloride; CF, hexachlorophene; OIP3, oxonia 3P; PHMG; T66, topax 66; TC, triclosan.

**Table 3.- Correlations between antibiotics and biocides in psychrotrophic pseudomonads (*log*-transformed).**

	AMP	AMX	CAZ	CHL	CL	ERY	GEN	IPM	KAN	PB	RIF	SMZ	STR	TET	TMP	BC	CE	CH	CF	PHMG	OIP3	T66	TC
AMP	<b>1</b>																						
AMX	<b>0.835**</b>	<b>1</b>																					
CAZ	-0.225	0.018	<b>1</b>																				
CHL	0.164	0.210	-0.200	<b>1</b>																			
CL	-0.291	-0.058	<b>0.996**</b>	-0.223	<b>1</b>																		
ERY	0.492	0.418	-0.030	0.456	-0.067	<b>1</b>																	
GEN	0.249	<b>0.627*</b>	0.341	0.281	0.279	0.096	<b>1</b>																
IPM	0.047	0.085	-0.048	-0.137	-0.049	-0.190	0.048	<b>1</b>															
KAN	0.297	<b>0.704**</b>	0.183	0.406	0.125	0.125	<b>0.932**</b>	0.068	<b>1</b>														
PB	-0.291	-0.055	<b>0.997**</b>	-0.222	<b>1.000**</b>	-0.064	0.282	-0.048	0.127	<b>1</b>													
RIF	<b>0.945**</b>	<b>0.822**</b>	-0.041	0.152	-0.109	0.519	0.332	-0.012	0.363	-0.109	<b>1</b>												
SMZ	0.452	0.256	-0.287	<b>0.602*</b>	-0.319	<b>0.575*</b>	0.219	-0.309	0.184	-0.324	0.377	<b>1</b>											
STR	-0.019	-0.001	-0.051	-0.172	-0.074	-0.149	0.378	-0.021	0.092	-0.072	-0.090	0.241	<b>1</b>										
TET	0.164	0.148	-0.177	0.065	-0.177	-0.023	-0.088	<b>0.922**</b>	0.001	-0.176	0.047	-0.148	-0.166	<b>1</b>									
TMP	0.344	0.276	-0.312	0.356	-0.348	<b>0.608*</b>	0.168	-0.296	0.216	-0.344	0.400	0.407	0.013	-0.272	<b>1</b>								
BC	0.323	0.400	0.310	-0.013	0.275	0.261	0.291	0.358	0.315	0.278	0.354	0.000	-0.244	0.249	-0.082	<b>1</b>							
CE	-0.281	-0.281	-0.073	-0.199	-0.054	-0.238	-0.205	-0.145	-0.194	-0.051	-0.213	-0.324	-0.056	-0.269	-0.357	0.188	<b>1</b>						
CH	0.418	<b>0.672**</b>	0.366	-0.198	0.315	-0.011	<b>0.588*</b>	0.424	0.489	0.319	0.377	-0.127	0.351	0.381	-0.238	0.289	-0.325	<b>1</b>					
CF	0.232	-0.091	<b>-0.667**</b>	0.325	<b>-0.678**</b>	0.213	-0.104	0.123	-0.085	<b>-0.679**</b>	0.213	0.475	0.130	0.094	0.507	0.000	0.077	-0.471	<b>1</b>				
PHMG	0.188	0.430	-0.086	0.237	-0.115	-0.057	0.520	<b>0.792**</b>	<b>0.626*</b>	-0.114	0.160	-0.058	-0.030	<b>0.726**</b>	-0.033	0.408	-0.230	0.471	0.167	<b>1</b>			
OIP3	0.142	0.188	0.186	-0.035	0.180	-0.369	0.081	-0.393	0.208	0.177	0.248	-0.229	-0.433	-0.405	-0.132	0.000	0.178	-0.091	-0.258	-0.194	<b>1</b>		
T66	0.398	0.432	-0.213	0.290	-0.247	<b>0.640*</b>	0.147	0.386	0.252	-0.242	0.414	0.168	-0.196	0.420	0.264	<b>0.577*</b>	0.217	0.125	0.354	0.471	-0.411	<b>1</b>	
TC	0.418	<b>0.672**</b>	0.369	-0.127	0.315	0.358	<b>0.588*</b>	-0.147	0.489	0.319	0.377	0.164	0.342	-0.160	0.095	0.289	-0.272	<b>0.708**</b>	-0.471	0.059	-0.092	0.125	<b>1</b>

Antimicrobials are: AMP, ampicillin; AMX, amoxicillin; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; CHL, chloramphenicol; CL, colistin; ERY, erythromycin; GEN, gentamycin; IPM, imipenem; KAN, kanamycin; PB, polymixin B; RIF, rifampicin; SMZ, sulfametoxazol; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TMP,

trimethoprim; BC, benzalkonium chloride; CE, cetrimide; CH, chlorhexidine dihydrochloride; CF, hexachlorophene; OIP3, oxonia 3P; PHMG; T66, topax 66; TC, triclosan.



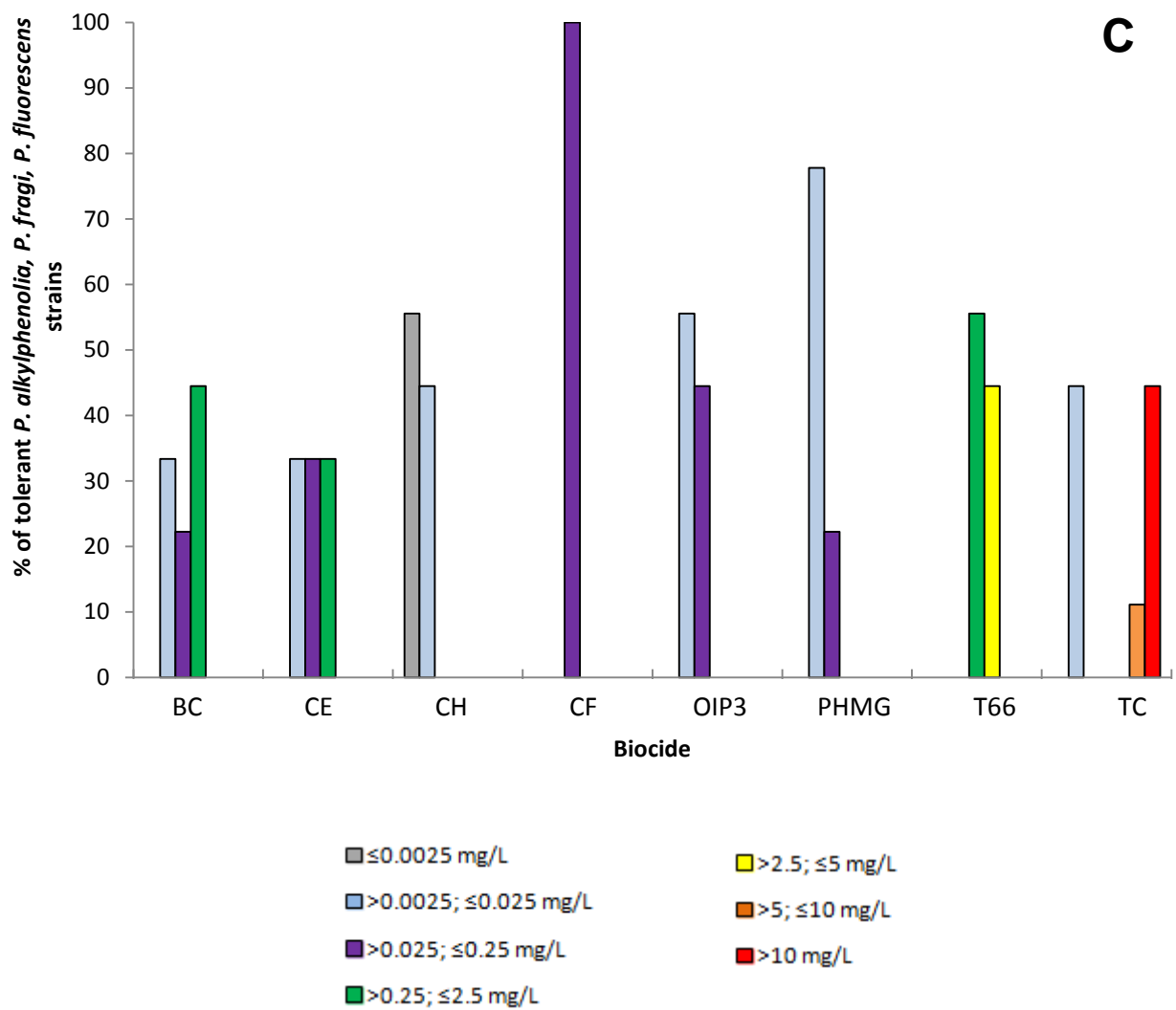
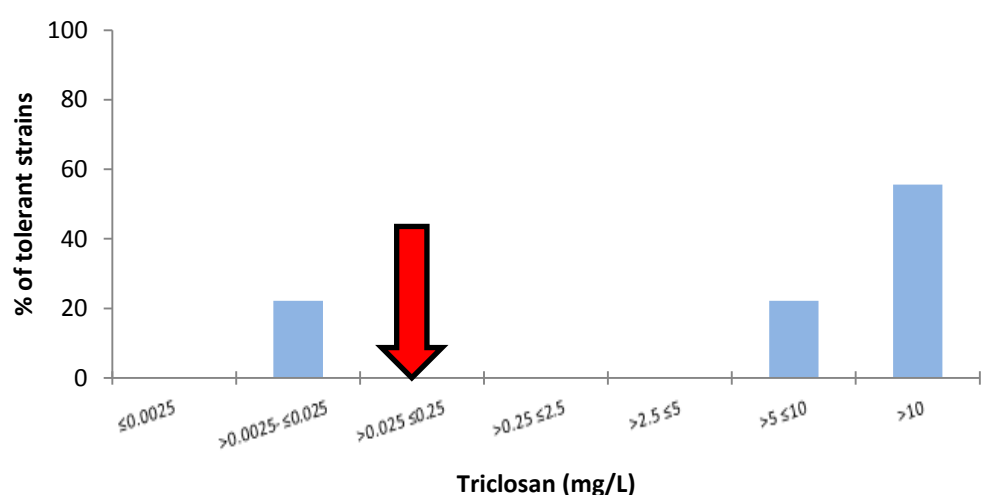
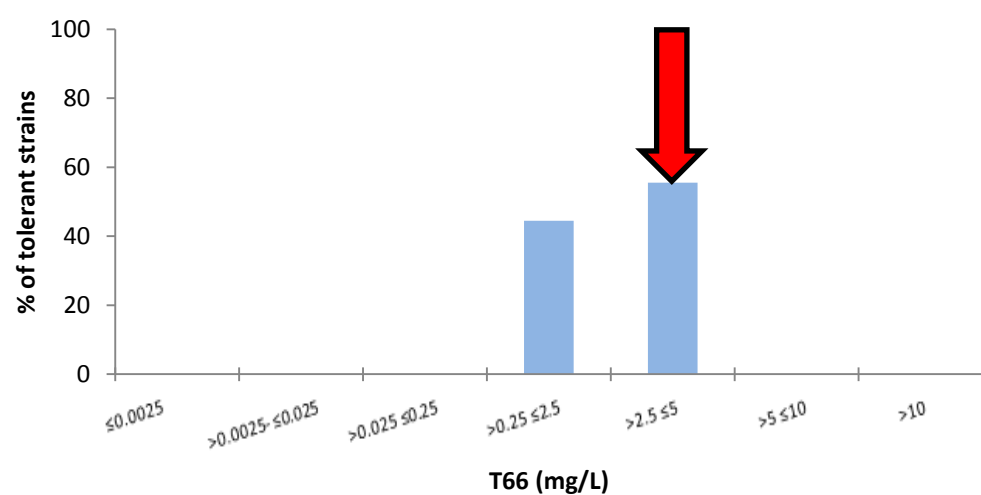
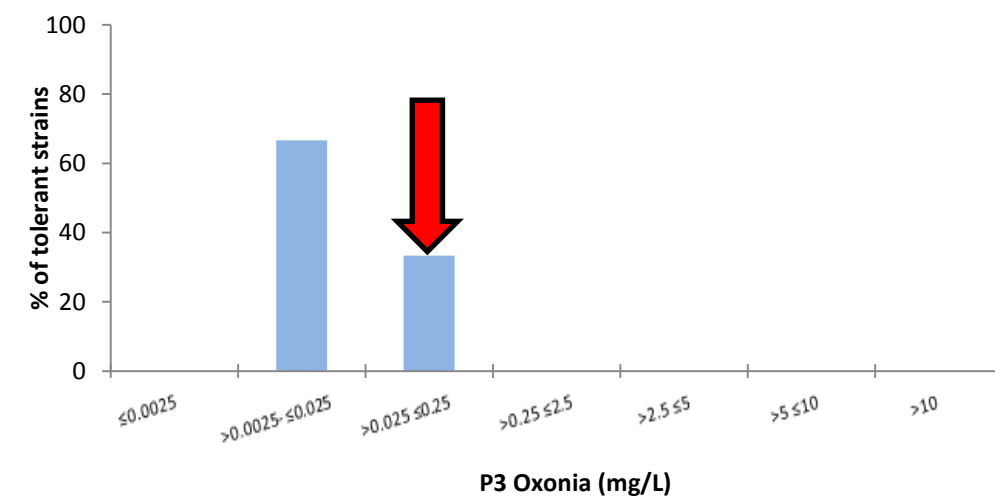
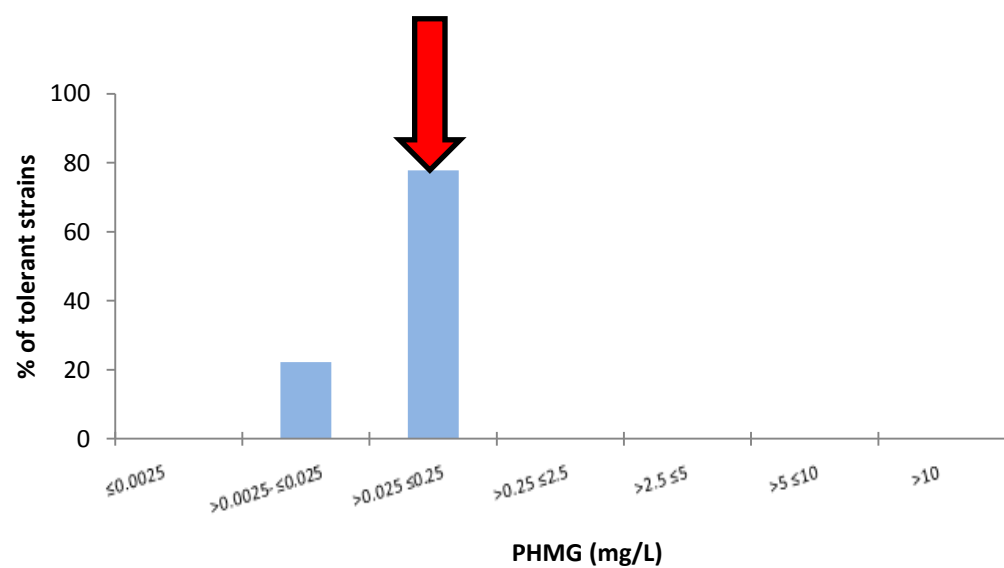
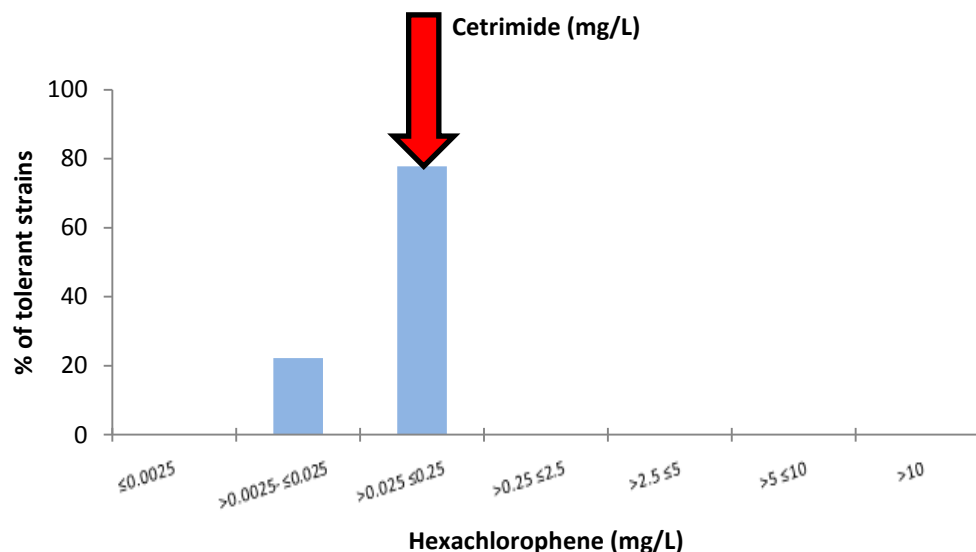
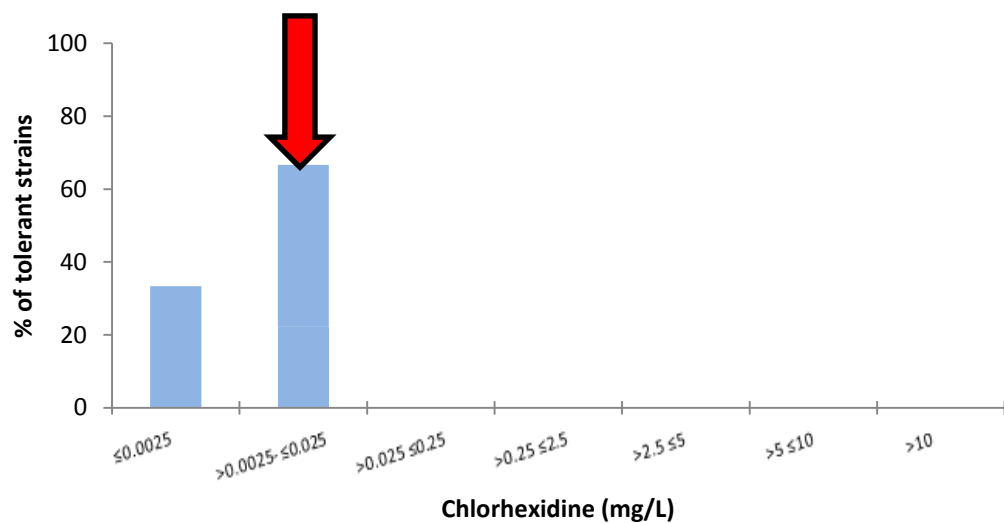
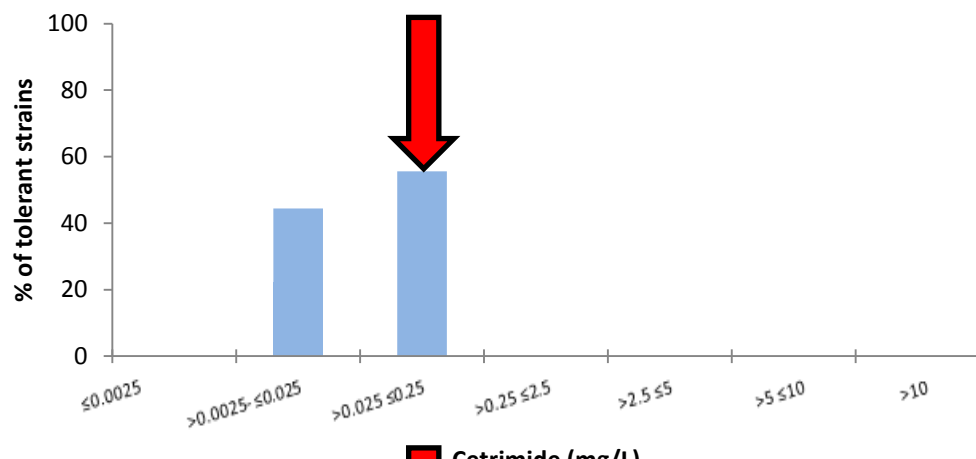
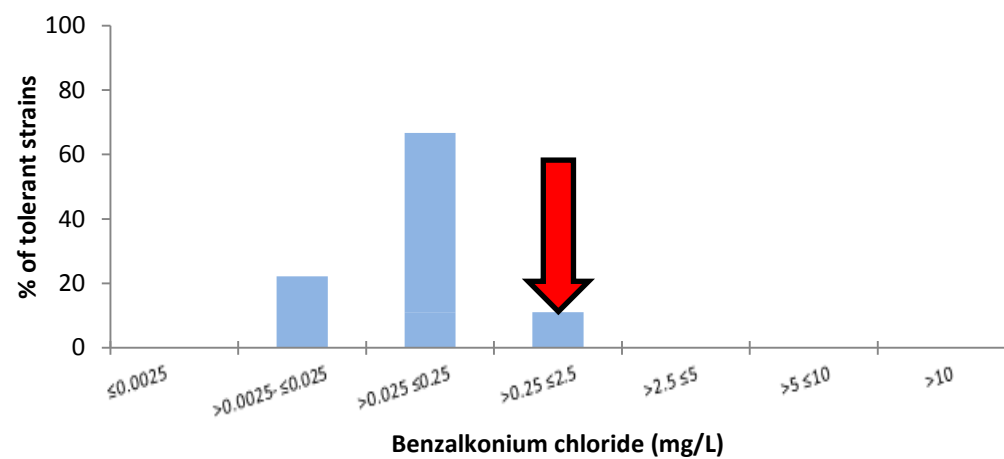
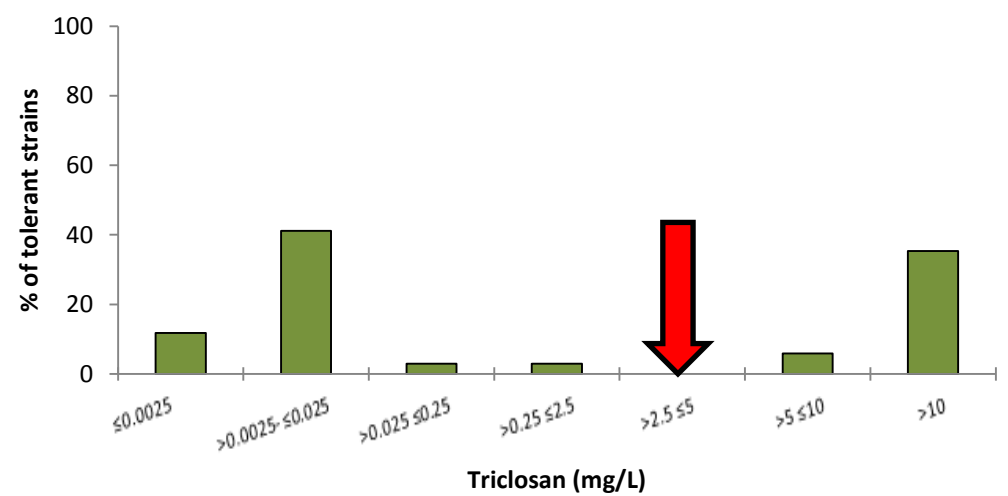
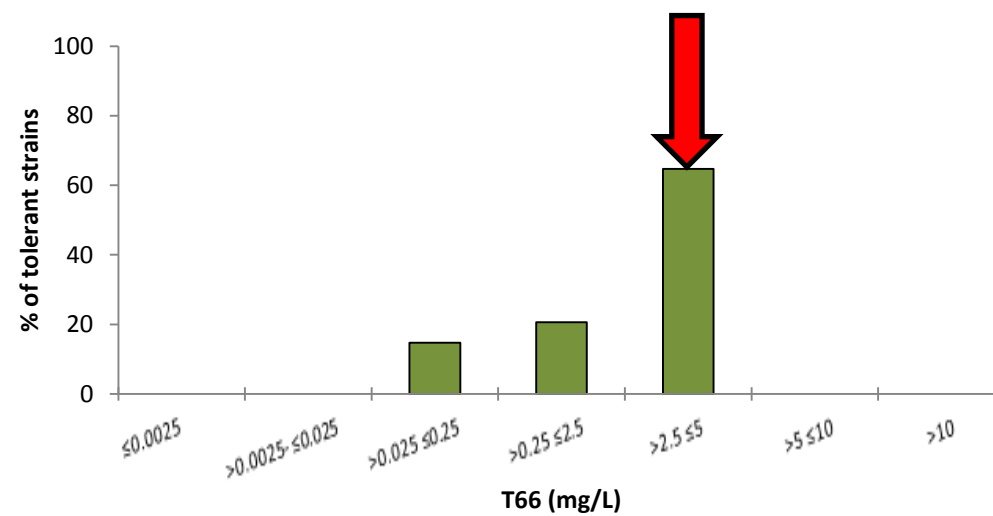
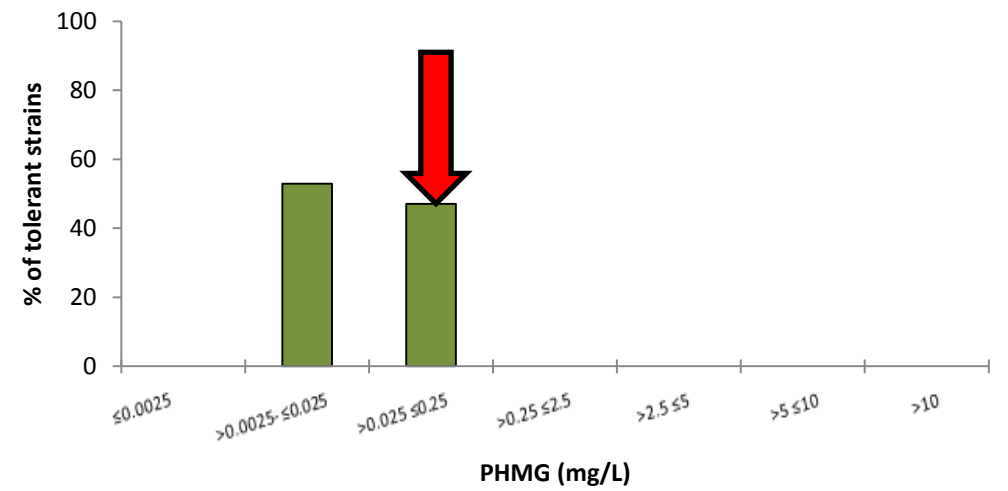
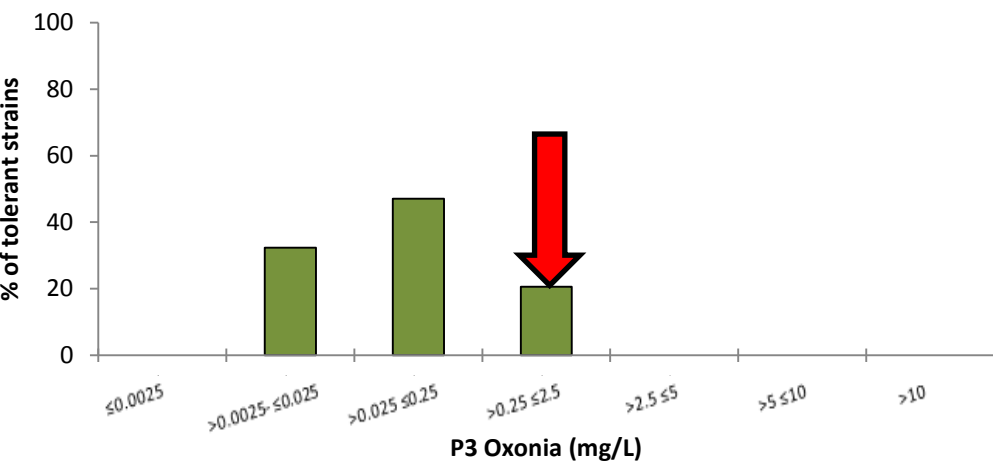
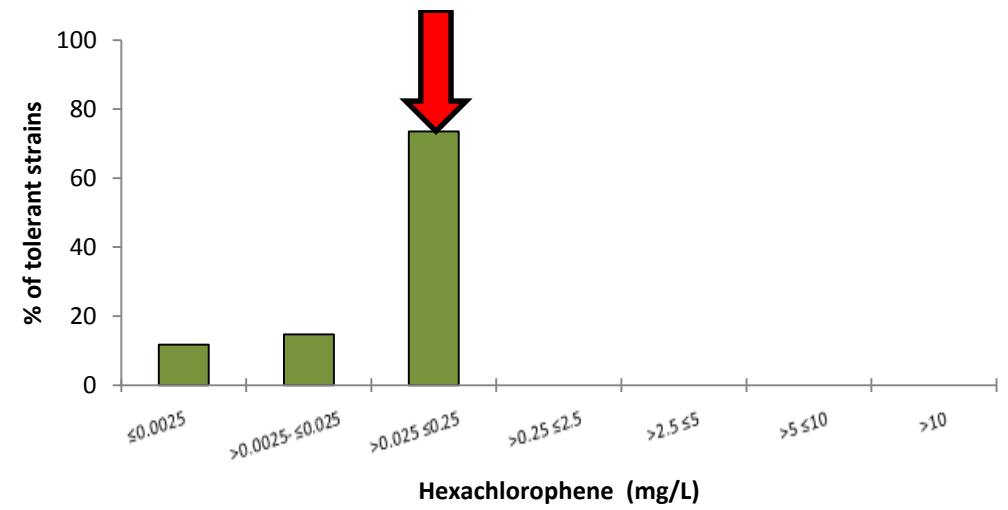
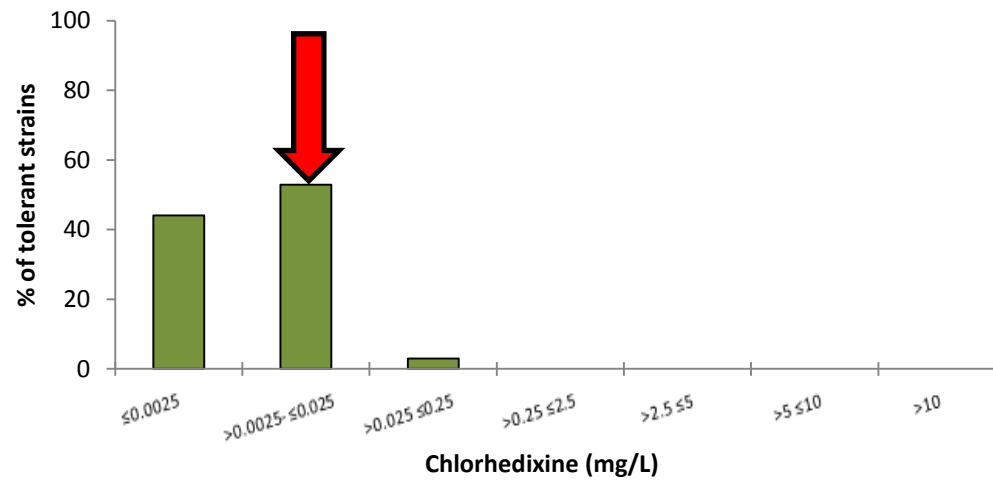
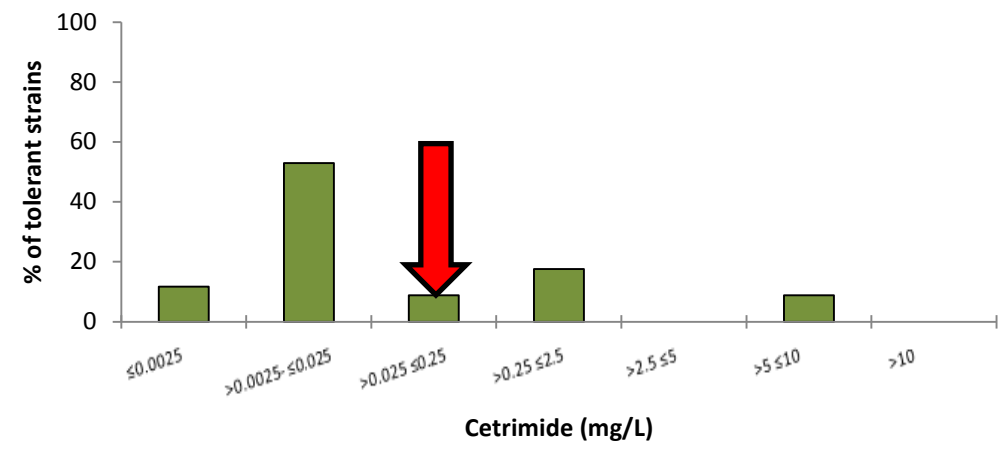
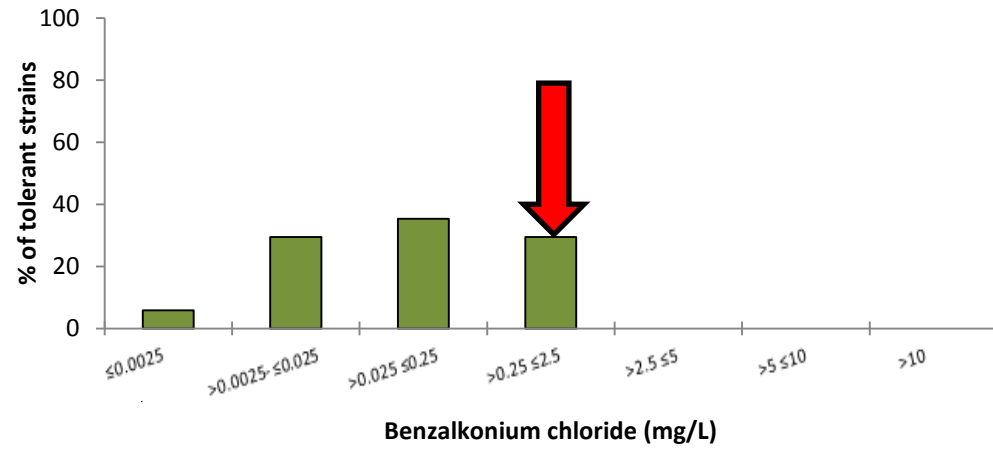


Figure 1







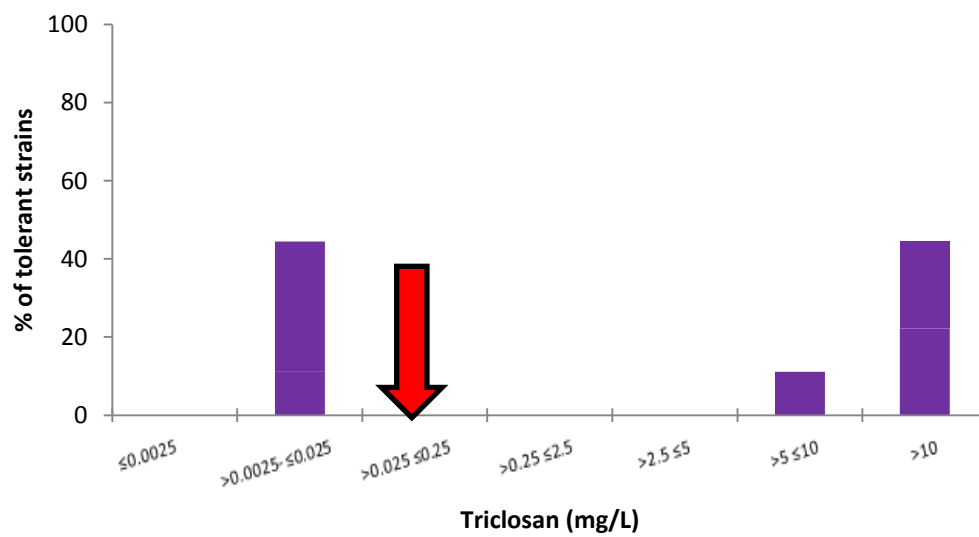
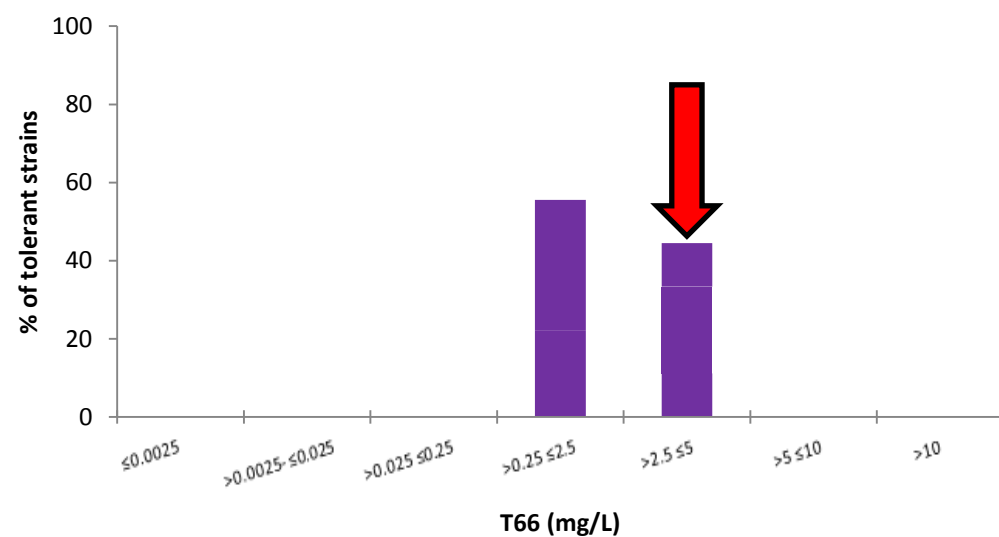
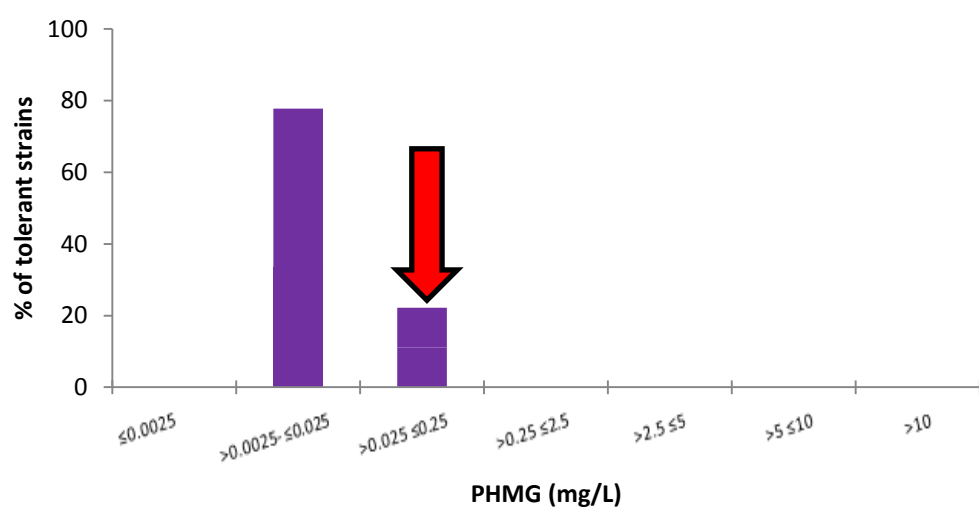
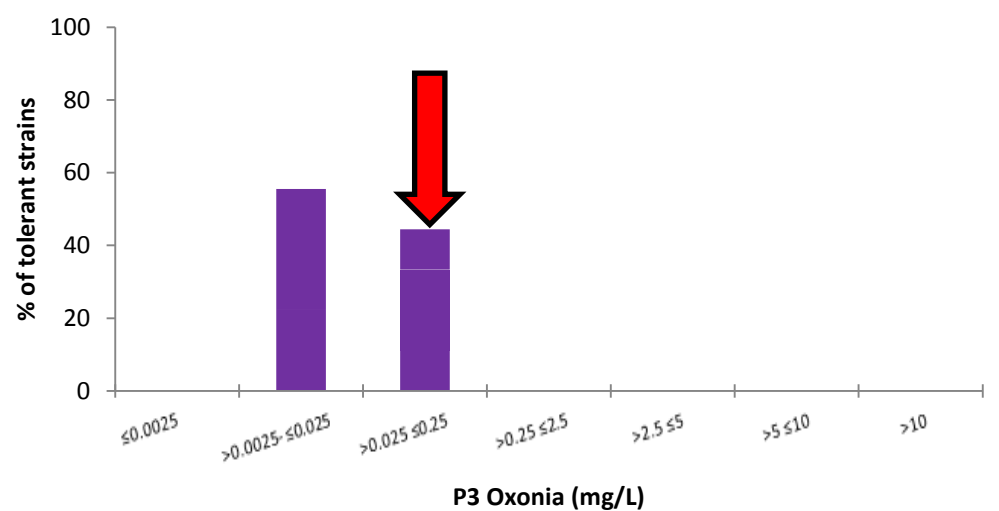
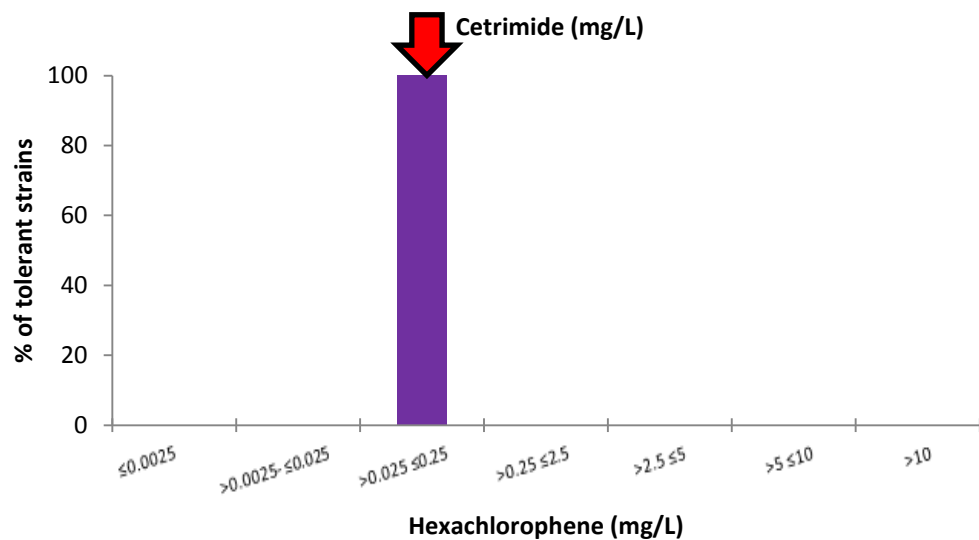
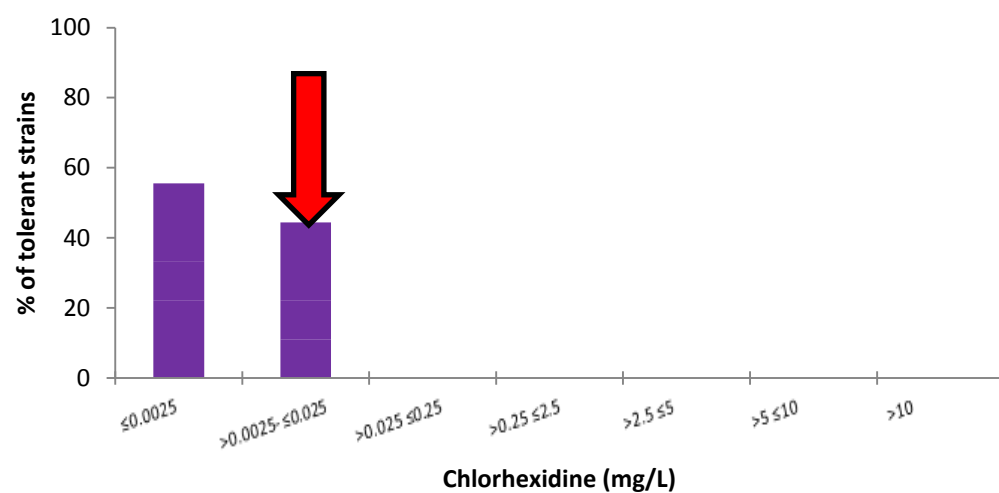
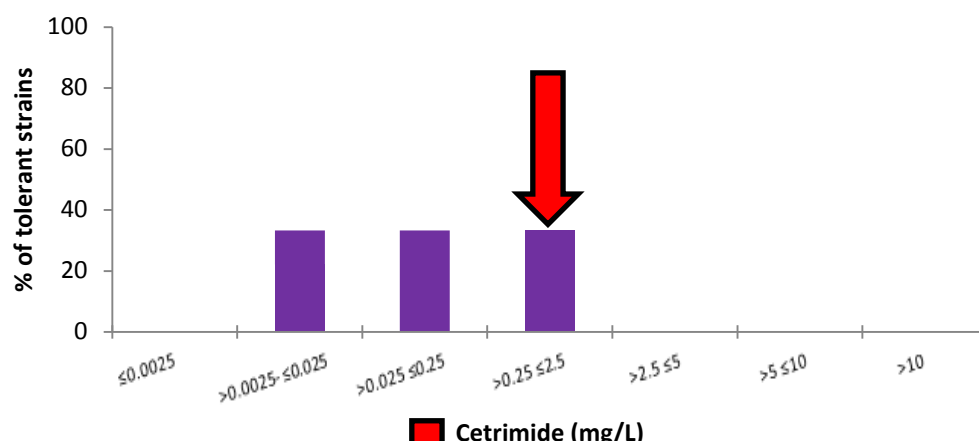
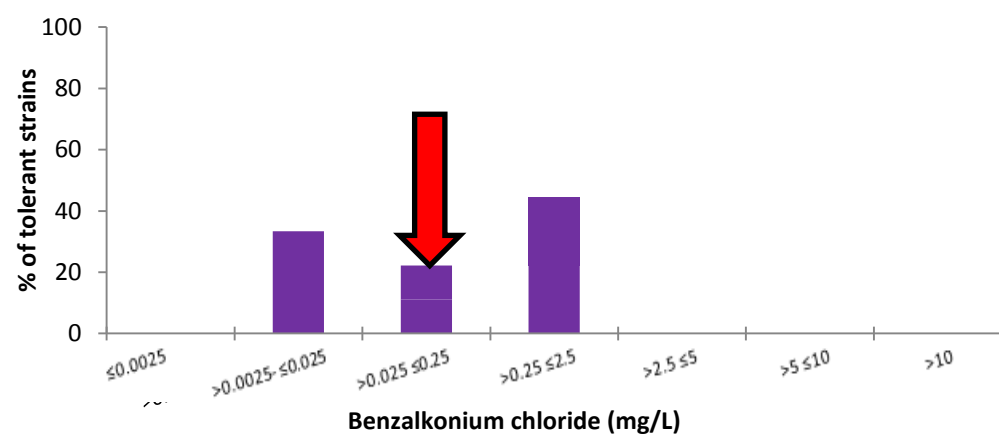


Figure 2

Lavilla Lerma et al.

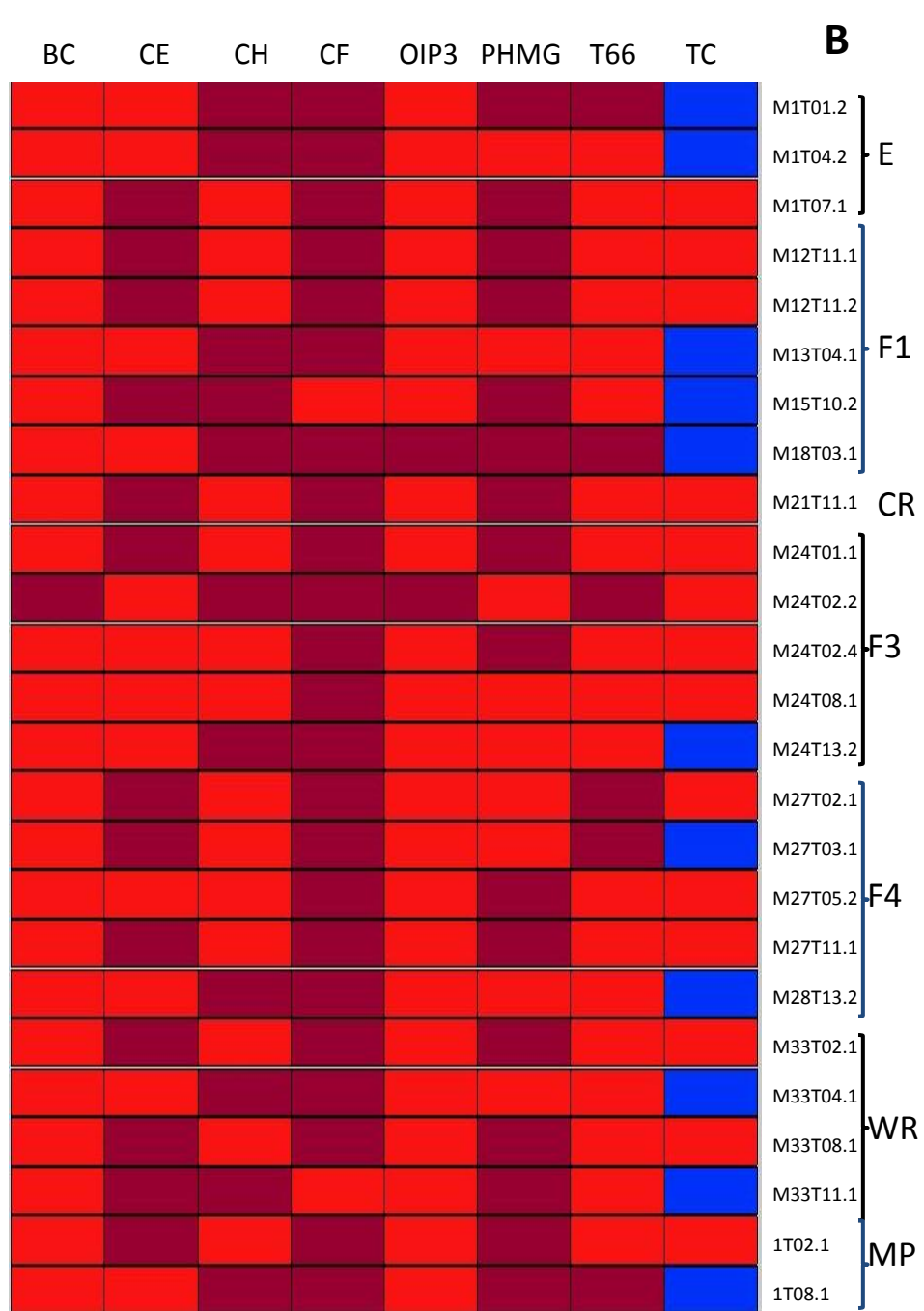
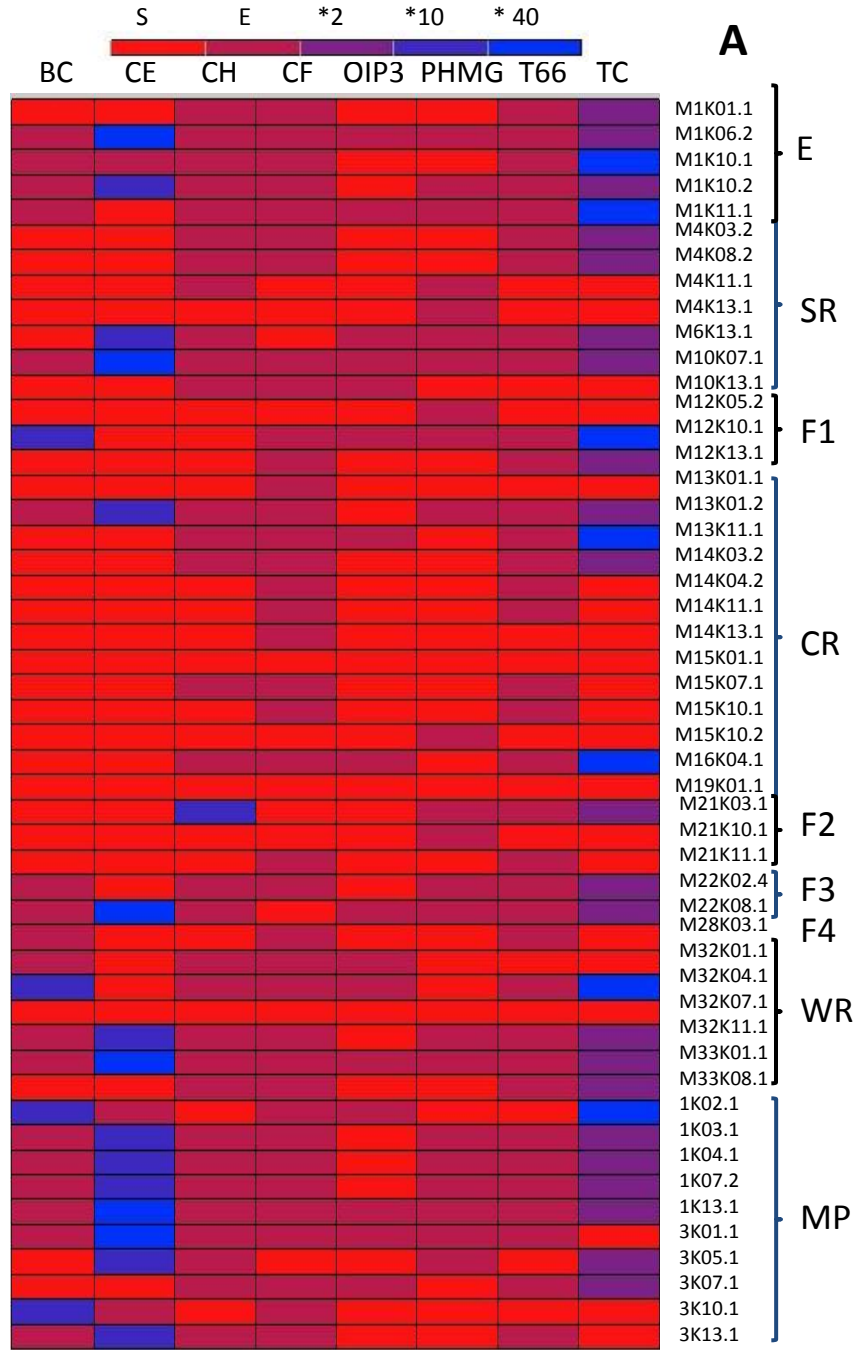


Figure 3

Lavilla Lerma et al.

### Capítulo III

**Incidencia de resistencias a antibióticos y biocidas en Enterococos aislados de productos tradicionales fermentados.**

## APORTACIÓN 1

**Antonio Sánchez Valenzuela, Leyre Lavilla Lerma, Nabil Benomar, Antonio Gálvez, Rubén Pérez Pulido, and Hikmate Abriouel. 2013. Phenotypic and Molecular Antibiotic Resistance Profile of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Different Traditional Fermented Foods. *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE* 10: 143-149.**

# Phenotypic and Molecular Antibiotic Resistance Profile of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Different Traditional Fermented Foods

Antonio Sánchez Valenzuela, Leyre Lavilla Lerma, Nabil Benomar, Antonio Gálvez, Rubén Pérez Pulido, and Hikmate Abriouel

## Abstract

A collection of 55 enterococci (41 *Enterococcus faecium* and 14 *E. faecalis* strains) isolated from various traditional fermented foodstuffs of both animal and vegetable origins, and water was evaluated for resistance against 15 antibiotics. Lower incidence of resistance was observed with gentamicin, ampicillin, penicillin and teicoplanin. However, a high incidence of antibiotic resistance was detected for rifampicin (12 out of 14 of isolates), ciprofloxacin (9/14), and quinupristin/dalfopristin (8/14) in *E. faecalis* strains. *Enterococcus faecium* isolates were resistant to rifampicin (25/41), ciprofloxacin (23/41), erythromycin (18/41), levofloxacin (16/41), and nitrofurantoin (15/41). One *Enterococcus faecalis* and two *E. faecium* strains were resistant to vancomycin (MIC > 16 µg/mL). Among 55 isolates, 27 (19 *E. faecium* and eight *E. faecalis*) were resistant to at least three antibiotics. High level of multidrug resistance to clinically important antibiotics was detected in *E. faecalis* strains (57% of *E. faecalis* versus 46% of *E. faecium*), which showed resistance to six to seven antibiotics, especially those isolated from foods of animal origin. So, it is necessary to re-evaluate the use of therapeutic antibiotics in stock farms at both regional and international levels due to the high number of multiple resistant (MR) bacteria. Fifty-six MR *E. faecalis* and *E. faecium* strains selected from this and previous studies (Valenzuela *et al.*, 2008, 2010) were screened by polymerase chain reaction for antibiotic resistance genes, revealing the presence of *tet*(L), *tet*(M), *ermB*, *cat*, *efrA*, *efrB*, *mphA*, or *msrA/B* genes. The ABC Multidrug Efflux Pump EfrAB was detected in 96% of *E. faecalis* strains and also in 13% of *E. faecium* strains; this is the first report describing EfrAB in this enterococcal species. The efflux pump-associated *msrA/B* gene was detected in 66.66% of *E. faecium* strains, but not in *E. faecalis* strains.

## Introduction

ENTEROCOCCI HAVE EMERGED as important nosocomial pathogens over the past decade (Dupre *et al.*, 2003; Van-kerckhoven *et al.*, 2004). Their ubiquitous nature determines their frequent finding in food as contaminants (Giraffa, 2002); they are implicated in food spoilage (Franz *et al.*, 1999), intoxication (Giraffa *et al.*, 1997), and the spreading of antibiotic resistance through the food chain (Leavis *et al.*, 2006). At the same time, enterococci possess many technological applications in the food industry as starter cultures (Foulquie-Moreno *et al.*, 2006), as potential biopreservatives (enterocin producers), and as probiotics (Stiles and Holzapfel, 1997); they are also responsible for the sensory characteristics of some fermented foods. The dualistic aspects of enterococci pose a great challenge concerning their presence in food products.

Enterococci have both an intrinsic and acquired resistance to antibiotics, making them important nosocomial pathogens (Murray *et al.*, 1990; Klare *et al.*, 2002, 2003; Hummel *et al.*, 2007). Vancomycin-resistant enterococci (VRE) are of major concern (Hershberger *et al.*, 2005; de Jong *et al.*, 2009). Enterococci readily acquire resistance genes (Dever, 2000) and are also capable of transferring resistance genes to other bacteria (Shepard and Gilmore, 2002; Lester *et al.*, 2006). Clinical practices and animal husbandry are important foci of selective antibiotic pressure, and the food chain has been shown to act as a reservoir of antibiotic resistance determinants to be spread to humans via various routes (Witte, 2000; Kojima *et al.*, 2010).

The present work aimed to study the antimicrobial resistance profiles and the incidence of genetic determinants of antimicrobial resistance in enterococci isolated from different traditional fermented foods including fermented milk

(Morocco and Spain), meat (Morocco), and vegetable products (Morocco, Spain, and Republic of Congo).

## Materials and Methods

### Bacterial strains and media

A total of 55 enterococci strains—26 strains isolated in the present study and 29 strains isolated by Valenzuela *et al.* (2008, 2010) from traditional foods and water used for traditional food preparation—belonging to the species of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* were used in this study (Table 1). The fermented milk products from Morocco that served as sources of enterococci were commercial butter, traditional cheese (Jben), commercial goat cheese (Valenzuela *et al.*, 2008), and fermented milk. Enterococci from goat milk cheeses of Southern Spain (qE isolates in Table 1) were also included. All fermented food products were traditional foods without starter cultures added. All strains were maintained and stored in brain-heart infusion (BHI) broth (Scharlab, Barcelona, Spain) containing 20% glycerol at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For routine use, enterococcal isolates were cultivated on BHI broth at  $37^{\circ}\text{C}$ .

### Identification of *E. faecium* and *E. faecalis* strains

Presumptive identification of isolates was carried out with the following tests: observation of colony characteristics and cell morphology, Gram staining, catalase, growth at  $10^{\circ}\text{C}$  and  $45^{\circ}\text{C}$ , growth in the presence of 6.5% NaCl, at pH 9.6, as well as growth and esculin hydrolysis on bile-esculin agar (Scharlab). The isolates identified as presumptive *Enterococcus* sp. were further identified at species level by species-specific polymerase chain reaction (PCR) to detect the *ddlE.faecalis* and *ddlE.faecium* genes. The primers used were 5'CAAACGTGTTGGCATTCCACAA3' and 5'TGGATTTCCTTTCCAGTCACTTC3' (*E. faecalis* forward and reverse primers respectively); and 5'GAAGAGCTGCTGCAAAATGCTTTAGC3' and 5'GCGCGCTTCAATTCCTGT3' (*E. faecium* forward and reverse primers respectively), as described elsewhere (Abriouel *et al.*, 2005).

### Antibiotic resistance

The antibiotic susceptibility of isolates was determined by using ATB ENTEROC 5 strips (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). The tests were performed by using the antibiotics described in Table 2 and following the manufacturer's instructions. Results were recorded after 24 h of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  and were evaluated according to the manufacturer's instructions (Table 2).

### PCR amplification for the detection of antibiotic resistance genes

PCR amplification of well-known structural genes of antibiotic resistance—erythromycin (*ermA,B,C*; *mefA,E*; *msrA,B*;

TABLE 2. ANTIBIOTIC RESISTANCE OF ENTEROCOCCI ISOLATED FROM DIFFERENT FOODS

Antibiotic	Antibiotic MIC breaking points <sup>a</sup> (mg/L)	Incidence of antibiotic resistance	
		<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
Ampicillin	8	0/14	1/41
Penicillin	8	0/14	1/41
Erythromycin	4	6/14	18/41
Tetracycline	8	5/14	6/41
Chloramphenicol	16	2/14	0/41
Rifampicin	2	12/14	25/41
Ciprofloxacin	2	9/14	23/41
Levofloxacin	4	1/14	16/41
Vancomycin	16	1/14	2/41
Teicoplanin	16	1/14	2/41
Nitrofurantoin	64	1/14	15/41
Gentamycin	500	0/14	0/41
Streptomycin	1000	2/14	3/41
Quinupristin/dalfopristin	2	8/14	5/41

<sup>a</sup>Values determined according to ATB ENTEROC 5 strips used in this study.

and *ereA,B*), tetracycline (*tet*[M], *tet*[O], *tet*[S], *tet*[K], and *tet*[L]), and chloramphenicol (*cat*)—was performed as reported by Hummel *et al.* (2007). PCR of *efrA* and *efrB* genes was done according to Lee *et al.* (2003).

## Results and Discussion

Enterococci strains isolated from different traditional fermented foods (of both animal and vegetable origins) and water were used in this study. Food samples were obtained from various regions: Spain, Morocco, and Republic of Congo. All isolates showed phenotypic properties typical of *E. faecium* and *E. faecalis* strains, i.e., they were Gram-positive cocci, catalase-negative, and hydrolyzed esculin in the presence of 40% bile salt. They grew at  $10^{\circ}\text{C}$  and  $45^{\circ}\text{C}$ , in the presence of 6.5% NaCl, at pH 9.6, and survived at  $70^{\circ}\text{C}$  for 30 min. According to PCR amplification with *E. faecium* and *E. faecalis* species-specific primers, 14 isolates were identified as *E. faecalis* and 41 were identified as *E. faecium*. Previous studies also showed a higher incidence of *E. faecium* in fermented capers (nine *E. faecium* versus four *E. faecalis* strains) (Pérez-Pulido *et al.*, 2006) and Slovak Bryndza Cheese (178 *E. faecium* versus 49 *E. faecalis* strains) (Jurkovic *et al.*, 2006). *E. faecium* is also one of the lactic acid bacteria (LAB) species that can be found in relatively high numbers during meat fermentation (Hugas *et al.*, 2003). In Argentinean artisanal dry fermented sausages, 56% of enterococcal isolates were identified as *E. faecium*, followed by *E. faecalis* (17%) and other species (*Enterococcus durans*, *Enterococcus casseliflavus*, and *Enterococcus mundtii*) (Fontana *et al.*, 2009). However, Trivedi *et al.* (2011) showed a high predominance of *E. faecalis* (127 strains) followed by *E. faecium* (77 strains) in foodstuffs of all origins (raw and pasteurized milk samples, cheeses of different varieties, ready-to-eat meat products, and various fruits and vegetables).

### Antibiotic sensitivity

The antibiotic susceptibility profile of isolates is summarized in Table 2. According to ATB ENTEROC 5 test, a lower

TABLE 1. ENTEROCOCCI ISOLATED FROM DIFFERENT TRADITIONAL FOOD PRODUCTS

Enterococci species	Cheese and butter	Fermented meat	Vegetable foods and water
<i>E. faecalis</i>	<i>n</i> = 9	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 4
<i>E. faecium</i>	<i>n</i> = 18	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 17



incidence of resistance was seen with clinically relevant antibiotics such as gentamicin, ampicillin, and penicillin (Table 2) in both *Enterococcus* species. However, a high incidence of antibiotic resistance was detected among *E. faecalis* isolates to rifampicin (12 out of 14 of isolates), ciprofloxacin (9/14), and quinupristin/dalfopristin (8/14). Furthermore, *E. faecalis* isolates showed an intermediate resistance to erythromycin (6/14) and tetracycline (5/14), and to a lesser extent to streptomycin (2/14), chloramphenicol (2/14), nitrofurantoin (1/14), levofloxacin (1/14), teicoplanin (1/14), and vancomycin (1/14). All *E. faecalis* isolates were susceptible to three antibiotics (ampicillin, penicillin, and gentamicin). On the other hand, *E. faecium* isolates were resistant to rifampicin (25/41), ciprofloxacin (23/41), erythromycin (18/41), levofloxacin (16/41), and nitrofurantoin (15/41). In addition, two isolates were resistant to vancomycin and teicoplanin, and one isolate was resistant to ampicillin and penicillin. All *E. faecium* isolates were susceptible to gentamicin and chloramphenicol. The results obtained in the current study were in accordance with those obtained in food isolates reported by Ben Omar *et al.* (2004), Pérez-Pulido *et al.* (2006), and Valenzuela *et al.* (2008) regarding resistance to rifampicin, ciprofloxacin, and erythromycin. Only *E. faecium* H2OP3 (a strain isolated from water used for preparation of food at Republic of Congo) was resistant to penicillin and ampicillin, and also to vancomycin and teicoplanin. Resistance of enterococci to glycopeptide antibiotics such as vancomycin and teicoplanin and to aminoglycosides (Kacmaz and Aksoy, 2005) is well documented. In this study, few *Enterococcus* strains were resistant to teicoplanin and simultaneously to vancomycin (Table 3), which could pose a great concern in clinical treatment, by increasing treatment failure by 20% and mortality from 27% to 52%, as reported by Brown *et al.* (2006). However, our results indicated an almost complete (97.6–100%) susceptibility of enterococcal isolates to ampicillin or penicillin as cell wall active agents and gentamicin (aminoglycoside). Thus, strains with resistance to vancomycin and/or teicoplanin are completely susceptible to ampicillin and penicillin, which is of great importance in health care because of their synergistic bactericidal effects against enterococci (Filipová *et al.*, 2006).

#### Multiple resistant (MR) enterococci

Analysis of antibiotic resistance pattern of enterococci isolates revealed multiple antibiotic resistant strains in food isolates in the same way as reported by Peters *et al.* (2003). Among the total of 55 strains analyzed, 27 strains (19 *E. faecium* and eight *E. faecalis*) were resistant to at least three antibiotics (Table 3). Furthermore, 29 MR enterococci of food origin previously evaluated by Valenzuela *et al.* (2008, 2010) were included in the present study for molecular screening of resistance genes.

In this study, MR *E. faecalis* strains showed various levels of antibiotic resistance: resistant to seven antibiotics (strain qE-29) and six antibiotics (strains qE-12 and qE-14). Similarly, some *E. faecalis* strains analyzed by Valenzuela *et al.* (2008, 2010) and included here for molecular studies showed resistance to eight antibiotics (strain Mz2), seven antibiotics (strains J3, J39 and J41), or six antibiotics (strain CM5). It is noteworthy that *E. faecalis* strains with resistance to six to eight antibiotics were isolated from foods of animal origin (Table 3). As shown in Table 3, VR *E. faecalis* qE-29 and Mz2 isolates

were also resistant to erythromycin, tetracycline, rifampicin, ciprofloxacin, levofloxacin, nitrofurantoin, and quinupristin/dalfopristin. Tetracycline and erythromycin resistance in foods of animal origin is likely related to the wide use of these classes of antibiotics in husbandry activities (Šustačková *et al.*, 2004; Kročko *et al.*, 2011). The vancomycin-resistant *E. faecalis* qE-29 was also resistant to teicoplanin (Table 3). Regarding antibiotic resistance in *E. faecium*, we detected resistance to five to six antibiotics in eight strains analyzed in this study (*E. faecium* H2OP3, KAA1, KAA3, KAA4, YA 2, qE-11, qE-18, and qE-23), all of them of animal origin except for H2OP3 (water) and only in three strains (*E. faecium* H2, Mz1B, and S1) reported previously by Valenzuela *et al.* (2008) and included in the current study. The presence of MR bacteria in foods may have a negative impact on treatment outcomes as well as increased treatment costs (Roberts *et al.*, 2009; Wassenberg *et al.*, 2010) due to their transmission to human via the food chain, especially foods of animal origin such as cheese and meat. The frequent occurrence of MR enterococci in farm animals and food products was reported by several authors (Peters *et al.*, 2003; Leclercq, 2009; Vignaroli *et al.*, 2011), highlighting the role of nonhuman reservoirs as sources of resistance genes. In this study, the percentage of MR *E. faecalis* (57% of *E. faecalis*) was higher than *E. faecium* (46% of *E. faecium*); this may be due to the presence of resistance genes in mobile genetic elements associated with *E. faecalis*.

#### Antibiotic resistance determinants

Detection of antibiotic resistance determinants was carried out by PCR amplification of known genes in 56 MR *E. faecalis* and *E. faecium* strains. The genetic basis of the observed tetracycline resistance (TetR) was investigated by PCR amplification of *tet* genes: *tet*(L), *tet*(K), *tet*(M), *tet*(S), and *tet*(O). All of the TetR strains carried either *tet*(L) or *tet*(M), or a combination of both determinants (Table 3). The gene *tet*(M) was the most common among the enterococci strains studied in a similar way as reported previously in food isolates (Aarestrup *et al.*, 2000; Huys *et al.*, 2004; Wilcks *et al.*, 2005), whereas *tet*(L) was the second-most common (Table 3); the combination of both determinants was mostly present among *E. faecium* isolates (13.33% in *E. faecium* versus 3.8% in *E. faecalis* strains). However, we could not detect by PCR the presence of *tet*(O), *tet*(S), and *tet*(K) genes in a manner similar to that reported by Wilcks *et al.* (2005) and Huys *et al.* (2004). In those cases, the incidence of *tet*(O) and *tet*(S) was very low (<10%); therefore, such low incidences may suggest that the chance of isolating enterococci bearing these resistances would be higher when the sample size is larger. Both *tet*(M) and *tet*(S) were found in raw products, whereas only *tet*(M) was found after fermentation, as reported by Teuber *et al.* (1999) and Gevers *et al.* (2003) in meat products.

All chloramphenicol resistant (CmR) isolates carried the *cat* gene, as reported in other studies (Werner *et al.*, 2000; Teuber *et al.*, 2003; Huys *et al.*, 2004). We determined that four CmR *E. faecalis* strains were also resistant to tetracycline. The occurrence of CmR among food enterococci has been frequently reported at various incidences (Teuber *et al.*, 1999; Franz *et al.*, 2001). *Cat* genes are located usually on plasmids such as the conjugative and mobilizing, multi-resistance plasmid pRE25 from *E. faecalis* (Schwarz *et al.*, 2001; Teuber *et al.*, 2003), the conjugative plasmid pUW1965 (Werner *et al.*,

TABLE 3. INCIDENCE OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN ENTEROCOCCAL ISOLATES FROM DIFFERENT FOODS

Isolate	Food source	Antibiotic resistance (identified resistance determinants)
<i>E. faecalis</i> Ac 8-2	Olives	RFA, CIP, QDA ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )
<i>E. faecalis</i> Oli1	Olives	ERY, TET, CMP, RFA, QDA <sup>a</sup> ( <i>ermB</i> , <i>cat</i> , <i>efrA</i> ) <i>efrB</i> , <i>tetM</i> )
<i>E. faecalis</i> Oli2	Olives	TET, RFA, QDA <sup>a</sup> ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )
<i>E. faecalis</i> Oli3	Olives	TET, RFA, QDA <sup>a</sup> ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> , <i>tetM</i> )
<i>E. faecalis</i> Oli4	Olives	ERY, TET, RFA <sup>a</sup> ( <i>ermB</i> , <i>efrA</i> , <i>efrB</i> , <i>tetM</i> )
<i>E. faecalis</i> Mz2	Cow meat salami	ERY, TET, RFA, CIP, LVX, VAN, FUR, QDA <sup>a</sup> ( <i>ermB</i> , <i>mphA</i> , <i>efrB</i> , <i>tetM</i> )
<i>E. faecalis</i> Mz4	Cow meat salami	RFA, CIP, QDA ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )
<i>E. faecalis</i> GM2	Goat milk	TET, RFA, CIP, LVX, FUR <sup>a</sup> ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> ) <i>tetM</i> )
<i>E. faecalis</i> GM43	Goat milk	TET, RFA, CIP, FUR, STH <sup>a</sup> ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> ) <i>tetM</i> )
<i>E. faecalis</i> CM5	Cow milk	TET, RFA, CIP, LVX, FUR, QDA <sup>a</sup> ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> ) <i>tetM</i> )
<i>E. faecalis</i> CM11	Cow milk	CIP, LVX, FUR <sup>a</sup>
<i>E. faecalis</i> Mq7.1	Butter	TET, RFA, CIP, QDA <sup>a</sup> ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> , <i>tetM</i> )
<i>E. faecalis</i> Mq7.2	Butter	TET, RFA, CIP, QDA <sup>a</sup> ( <i>ermB</i> , <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )
<i>E. faecalis</i> Mq7.4	Butter	TET, RFA, CIP, LVX <sup>a</sup> ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> , <i>tetM</i> )
<i>E. faecalis</i> qE-12	Cheese	ERY, TET, CMP, RFA, STH, QDA ( <i>ermB</i> , <i>cat</i> ) <i>efrA</i> , <i>efrB</i> , <i>tetM</i> )
<i>E. faecalis</i> qE-14	Cheese	ERY, TET, CMP, RFA, STH, QDA ( <i>ermB</i> , <i>cat</i> ) <i>efrA</i> , <i>efrB</i> , <i>tetM</i> )
<i>E. faecalis</i> qE-20	Cheese	RFA, CIP, QDA ( <i>ermB</i> , <i>efrB</i> )
<i>E. faecalis</i> qE-21	Cheese	RFA, CIP, QDA ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )
<i>E. faecalis</i> qE-27	Cheese	TET, RFA, CIP ( <i>ermB</i> , <i>efrA</i> , <i>efrB</i> , <i>tetL</i> )
<i>E. faecalis</i> qE-29	Cheese	ERY, RFA, CIP, LVX, VAN, TEC, QDA ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )
<i>E. faecalis</i> FB1	Cheese	ERY, TET, CMP, RFA, CIP <sup>a</sup> ( <i>cat</i> , <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )
<i>E. faecalis</i> FB2	Cheese	ERY, TET, RFA <sup>a</sup> ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )
<i>E. faecalis</i> FB3	Cheese	TET, RFA, CIP, FUR, QDA <sup>a</sup> ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> ) <i>tetM</i> )
<i>E. faecalis</i> J3	Cheese	TET, RFA, CIP, LVX, FUR, STH, QDA <sup>a</sup> ( <i>efrA</i> ) <i>efrB</i> , <i>tetM</i> , <i>tetL</i> )
<i>E. faecalis</i> J39	Cheese	TET, RFA, CIP, LVX, FUR, STH, QDA <sup>a</sup> ( <i>efrA</i> ) <i>efrB</i> , <i>tetM</i> )
<i>E. faecalis</i> J41	Cheese	TET, RFA, CIP, LVX, FUR, STH, QDA <sup>a</sup> ( <i>efrA</i> ) <i>efrB</i> , <i>tetM</i> )
<i>E. faecium</i> H2OP3	Water	ERY, RFA, VAN, TEC, QDA ( <i>msrA/B</i> , <i>efrA</i> ) <i>efrB</i> )
<i>E. faecium</i> Tg6	Ginger beer	ERY, RFA, CIP, QDA ( <i>msrA/B</i> , <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )
<i>E. faecium</i> VP3 01	Palm wine	ERY, RFA, CIP, LVX ( <i>msrA/B</i> )
<i>E. faecium</i> VP3 02	Palm wine	RFA, CIP, LVX
<i>E. faecium</i> H1	Ground pepper	ERY, CIP, LVX, FUR <sup>a</sup> ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> )
<i>E. faecium</i> H2	Ground pepper	ERY, RFA, CIP, LVX, FUR <sup>a</sup> ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> ) <i>efrB</i> )
<i>E. faecium</i> H3	Ground pepper	ERY, CIP, LVX, FUR <sup>a</sup> ( <i>msrA/B</i> )
<i>E. faecium</i> H4	Ground pepper	ERY, CIP, LVX, FUR <sup>a</sup> ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> )
<i>E. faecium</i> PE 2-2	Fish	RFA, CIP, LVX, FUR <sup>b</sup>
<i>E. faecium</i> Sln 1	Blood sausage	TET, RFA, CIP, LVX ( <i>tetM</i> , <i>tetL</i> )
<i>E. faecium</i> Sln2	Blood sausage	TET, CIP, LVX, FUR ( <i>tetL</i> )
<i>E. faecium</i> KAA 1	Blood sausage	ERY, TET, CIP, FUR, STH ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> ) <i>tetM</i> , <i>tetL</i> )
<i>E. faecium</i> KAA 3	Blood sausage	TET, RFA, CIP, LVX, FUR, STH ( <i>tetM</i> , <i>tetL</i> )
<i>E. faecium</i> KAA 4	Blood sausage	ERY, TET, RFA, CIP, LVX ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> )
<i>E. faecium</i> Mz1B	Cow meat salami	ERY, RFA, CIP, LVX, VAN, TEC <sup>a</sup> ( <i>msrA/B</i> ) <i>ermB</i> )
<i>E. faecium</i> Mz3B	Cow meat salami	CIP, VAN, TEC <sup>a</sup>
<i>E. faecium</i> S1	Turkey salami	ERY, TET, RFA, CIP, LVX, FUR <sup>a</sup> ( <i>msrA/B</i> ) <i>ermB</i> , <i>tetM</i> , <i>tetL</i> )
<i>E. faecium</i> YA 2	Fermented milk	ERY, RFA, CIP, LVX, QDA ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> )
<i>E. faecium</i> YA 6	Fermented milk	ERY, CIP, LVX ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> )
<i>E. faecium</i> YA 9-A	Fermented milk	ERY, CIP, LVX ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> )
<i>E. faecium</i> YA 9-B	Fermented milk	ERY, CIP, LVX ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> )
<i>E. faecium</i> Mq1	Butter	ERY, CIP, LVX, FUR <sup>a</sup> ( <i>msrA/B</i> ,)
<i>E. faecium</i> Mq2	Butter	ERY, CIP, LVX, FUR <sup>a</sup> ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> )
<i>E. faecium</i> Mq3	Butter	ERY, CIP, LVX, FUR <sup>a</sup> ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> )
<i>E. faecium</i> qE-11	Cheese	ERY, RFA, CIP, LVX, FUR, QDA
<i>E. faecium</i> qE-17	Cheese	RFA, CIP, FUR
<i>E. faecium</i> qE-18	Cheese	ERY, RFA, CIP, LVX, FUR ( <i>msrA/B</i> )
<i>E. faecium</i> qE-23	Cheese	ERY, RFA, CIP, LVX, FUR ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> )
<i>E. faecium</i> qE-24	Cheese	VAN, TEC, FUR ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )
<i>E. faecium</i> qE-26	Cheese	RFA, CIP, FUR

<sup>a,b</sup>Antibiotic resistance phenotypes were determined previously by Valenzuela *et al.* (2008, 2010), respectively.

2000), and pRUM, a non-conjugative, multidrug-resistance plasmid from *E. faecium* (Grady and Hayes, 2003). The sequences of the enterococcal *cat* genes found on plasmids usually contain genetic segments of small staphylococcal or streptococcal (i.e., pIP501) plasmids, indicating that these

genes were originally obtained from *Streptococcus* or *Staphylococcus* spp. (Pepper *et al.*, 1986; Grady and Hayes, 2003; Klare *et al.*, 2003).

Twenty-nine (52%) of the MR enterococci strains were resistant to erythromycin (EmR). These strains were tested for

the presence of *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *msrA/B*, *ereA/B*, *mefA/E*, and *mphA* genes. 66.66% of *E. faecium* strains (which includes 20 of the 21 EmR MR *E. faecium*) yielded positive results for the PCR with primers for the efflux pump-associated *msrA/B* gene. This gene has also been detected previously in EmR *E. faecium* from foods but not in *E. faecalis* (Portillo *et al.*, 2000; Hummel *et al.*, 2007; Toomey *et al.*, 2010), which is in accordance with the results obtained in the present study. In fact, none of the EmR *E. faecalis* strains harbored *msrA/B* genes. However, clinical *E. faecalis* isolates showed the presence of *msrA/B* genes, as reported by Chouchani *et al.* (2012). None of the EmR strains tested positive for *erm*(C), *ereA/B*, *mefA/E*, and *mphA* genes. The gene *erm*(B) was detected in eight EmR *E. faecium* and five *E. faecalis* strains. These data are in accordance with the studies of Jensen *et al.* (1999) and Khan *et al.* (2002), who found that *erm*(B) was the dominating EmR gene among enterococci. Jensen *et al.* (1999) observed that only 88% of EmR isolates contained *erm*(B), while *erm*(A) and *erm*(C) genes were not detected, indicating that other resistance mechanisms must also occur in enterococci. This was confirmed by Portillo *et al.* (2000) and Hummel *et al.* (2007). Furthermore, *erm*(B) was also detected in three additional *E. faecalis* strains for which erythromycin resistance was not detected by phenotype; those results were also obtained by McBride *et al.* (2007) in *E. faecalis*. This data could be explained by the fact that the *erm*(B) gene could be a silent gene or may lack functionality. The *erm*(B) genes are well known to occur on either conjugative plasmids such as pAMb1 (Martin *et al.*, 1987), pRE25 (Teuber *et al.*, 2003), and pUW1965 (Werner *et al.*, 2000), or on transposons such as Tn917 (Shaw and Clewell, 1985), Tn1545 (Courvalin and Carlier, 1987), Tn5384, and Tn5385 (Bonafede *et al.*, 1997), often linked with other antibiotic resistance determinants. Some EmR strains did not show amplification of *ermA,B,C*, *ereA/B*, *mphA*, *mefA/E*, and *msrA/B* genes, and thus, the mechanism and associated genes for this observed EmR are still unclear.

Regarding the multidrug efflux pump EfrAB, the results obtained in this study indicated that 96% of *E. faecalis* strains possess *efrA* and/or *efrB* genes, whereas only 13% of *E. faecium* strains carried *efrA* and *efrB* genes. This is the first work describing the presence of the ABC Multidrug Efflux Pump in *E. faecium* previously reported in *E. faecalis* (Lee *et al.*, 2003), which suggests the possibility of co-transfer of resistance genes between both species in foods.

## Conclusion

Our results suggest that fermented foods of both animal and vegetable origins are possible reservoirs of multi-drug-resistant enterococci. The isolates were resistant to three or more antibiotics simultaneously, so enterococci strains should come under tighter control. Due to the high number of MR *E. faecium* and *E. faecalis* strains with resistance to common antibiotics, it is necessary to re-evaluate the use of therapeutic antibiotics in stock farms at both regional and international levels.

## Acknowledgments

This work was supported by grants AGL2009-08921, P08-AGR-4295, Plan propio de la Universidad de Jaén, and Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario CeIA3.

## Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

## References

- Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diag Microbiol Infect Dis* 2000;37:127–137.
- Abriouel H, Lucas R, Ben Omar N, Valdivia E, Maqueda M, Martínez-Cañamero M, Gálvez A. Enterocin AS-48RJ: A variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. *Syst Appl Microbiol* 2005;28:383–397.
- Ben Omar N, Castro A, Lucas R, Abriouel H, Yousif NM, Franz CM, Holzapfel WH, Pérez-Pulido R, Martínez-Cañamero M, Gálvez A. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst Appl Microbiol* 2004; 27:118–130.
- Bonafede ME, Carias LL, Rice LB. Enterococcal transposon Tn5384: Evolution of a composite transposon through coin-tegration of enterococcal and staphylococcal plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1854–1858.
- Brown DF, Brown NM, Cookson BD, Duckworth G, Farrington M, French GL, King L, Lewis D, Livermore DM, Macrae B, Scott GM, Williams D, Woodford N. National glycopeptide-resistant enterococcal bacteraemia surveillance Working Group report to the Department of Health–August 2004. *J Hosp Infect* 2006;62:1–27.
- Chouchani C, El Salabi A, Marrakchi R, Ferchichi L, Walsh TR. First report of *mefA* and *msrA/msrB* multidrug efflux pumps associated with *bla*<sub>TEM-1</sub>  $\beta$ -lactamase in *Enterococcus faecalis*. *Int J Infect Dis* 2012;16:e104–e109.
- Courvalin P, Carlier C. Tn1545: A conjugative shuttle transposon. *Mol Gen Genet* 1987;206:259–264.
- de Jong A, Bywater R, Butty P, Deroover E, Godinho K, Klein U, Marion H, Simjee S, Smets K, Thomas V, Vallé M, Wheadon A. A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:733–744.
- Dever LL. Emerging antibiotic resistance in nosocomial pathogens. In: *RT: For Decision Makers in Respiratory Care*. 2000;Aug/Sept.
- Duprè I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J Med Microbiol* 2003;52:491–498.
- Filipová M, Bujdákova H, Drahovská H, Lisková A, Hanzen J. Occurrence of aminoglycoside-modifying-enzyme genes *aac*(6′)-*aph*(2″), *aph*(3′), *ant*(4′) and *ant*(6) in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* resistant to high-level of gentamicin and amikacin. *Folia Microbiol (Praha)* 2006;51:57–61.
- Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 2006;106:1–24.
- Fontana C, Gazzola S, Cocconcini PS, Vignolo G. Population structure and safety aspects of *Enterococcus* strains isolated from artisanal dry fermented sausages produced in Argentina. *Lett Appl Microbiol* 2009;49:411–414.
- Franz CM, Holzapfel WH, Stiles ME. Enterococci at the cross-roads of food safety? *Int J Food Microbiol* 1999;47:1–24.
- Franz CM, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NM, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel WH. Incidence of virulence factors and

- antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:4385–4389.
- Gevers D, Danielsen M, Huys G, Swings J. Molecular characterization of tet(M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented sausage. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:1270–1275.
- Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev* 2002;26:163–171.
- Giraffa G, Carminati D, Neviani E. Enterococci isolated from dairy products: A review of risks and potential technological use. *J Food Prot* 1997;60:732–738.
- Grady R, Hayes F. Axe-Txe, a broad-spectrum proteotoxin-antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate of *Enterococcus faecium*. *Mol Microbiol* 2003;47:1419–1432.
- Hershberger E, Oprea SF, Donabedian SM, Perri M, Bozigar P, Bartlett P, Zervos MJ. Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:127–130.
- Hugas M, Garriga M, Aymerich MT. Functionality of enterococci in meat products. *Int J Food Microbiol* 2003;88:223–233.
- Hummel A, Holzapfel WH, Franz CM. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst Appl Microbiol* 2007;30:1–7.
- Huys G, D'Haene K, Collard JM, Swings J. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:1555–1562.
- Jensen LB, Frimodt-Møller N, Aarestrup FM. Presence of erm gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiol Lett* 1999;170:151–158.
- Jurkovic D, Krizková L, Sojka M, Belicová A, Dusinský R, Krajcovic J, Snauwaert C, Naser S, Vandamme P, Vancanneyt M. Molecular identification and diversity of enterococci isolated from Slovak Bryndza cheese. *J Gen Appl Microbiol* 2006;52:329–337.
- Kacmaz B, Aksoy A. Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25:535–538.
- Kročko M, Čanigová M, Ducková V, Artimová A, Bezeková J, Poston J. Antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from raw foods of animal origin in south west part of Slovakia. *Czech J Food Sci* 2011;29:654–659.
- Khan AA, Nawaz MS, Khan SA, Steele R. Detection and characterization of erythromycin-resistant methylase genes in Gram-positive bacteria isolated from poultry litter. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;59:377–381.
- Klare I, Werner G, Witte W. Enterococci. Habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics. In: *Emerging Bacterial Pathogens, Contributions to Microbiology*. Mühldorfer I, Schäfer KP (eds.). Basel: Karger, 2002, pp. 108–122.
- Klare I, Konstabel C, Badstübner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol* 2003;88:269–290.
- Kojima A, Morioka A, Kijima M, Ishihara K, Asai T, Fujisawa T, Tamura Y, Takahashi T. Classification and antimicrobial susceptibilities of *Enterococcus* species isolated from apparently healthy food-producing animals in Japan. *Zoonoses Public Health* 2010;57:137–141.
- Leavis HL, Bonten MJM, Willems RJL. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: Global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:454–460.
- Leclercq R. Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:224–231.
- Lee EW, Huda MN, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3733–3738.
- Lester CH, Frimodt-Møller N, Sørensen TL, Monnet DL, Hammerum AM. *In vivo* transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:596–599.
- Martin B, Alloing G, Méjean V, Claverys JP. Constitutive expression of erythromycin resistance mediated by the ermAM determinant of plasmid pAM beta 1 results from deletion of 50 leader peptide sequences. *Plasmid* 1987;18:250–253.
- McBride SM, Fischetti VA, Leblanc DJ, Moellering RC Jr, Gilmore MS. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* 2007;7:e582.
- Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:46–65.
- Pepper K, Le Bouguénec C, de Cespédès G, Horaud T. Dispersal of a plasmid-borne chloramphenicol-resistance gene in streptococcal and enterococcal plasmids. *Plasmid* 1986;16:195–203.
- Pérez-Pulido R, Abriouel H, Ben Omar N, Lucas R, Martínez-Cañamero M, Gálvez A. Safety and potential risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food Chem Toxicol* 2006;44:2070–2077.
- Peters J, Mac K, Wichmann-Schauer H, Klein G, Ellerbroek L. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *Int J Food Microbiol* 2003;88:311–314.
- Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:967–971.
- Roberts RR, Hota B, Ahmad I, Scott RD 2nd, Foster SD, Abbasi F, Schabowski S, Kampe LM, Ciavarella GG, Supino M, Naples J, Cordell R, Levy SB, Weinstein RA. Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: Implications for antibiotic stewardship. *Clin Infect Dis* 2009;49:1175–1184.
- Schwarz FW, Perreten V, Teuber M. Sequence of the 50-kb conjugative multiresistance plasmid pRE25 from *Enterococcus faecalis* RE25. *Plasmid* 2001;46:170–187.
- Shaw JH, Clewell DB. Complete nucleotide sequence of macro-lide-lincosamide-streptogramin B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* 1985;164:782–796.
- Shepard BD, Gilmore MS. Antibiotic-resistant enterococci: The mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microb Infect* 2002;4:215–224.
- Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* 1997;36:1–29.
- Šustačková A, Naprávníková E, Schlegelova J. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolates from raw beef and meat products. *Folia Microbiol* 2004;49:411–417.
- Teuber M, Meile L, Schwarz F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Anton van Leeuwenhoek* 1999;76:115–137.
- Teuber M, Schwarz F, Perreten V. Molecular structure and evolution of the conjugative multiresistance plasmid pRE25 of *Enterococcus faecalis* isolated from a raw fermented sausage. *Int J Food Microbiol* 2003;88:325–329.
- Toomey N, Bolton D, Fanning S. Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Res Microbiol* 2010;161:127–135.

- Trivedi K, Cupakova S, Karpiskova R. Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Vet Med* 2011;56:352–357.
- Valenzuela AS, Omar NB, Abriouel H, López RL, Ortega E, Cañamero MM, Gálvez A. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: Determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food Chem Toxicol* 2008;46:2648–2652.
- Valenzuela AS, Benomar N, Abriouel H, Cañamero MM, Gálvez A. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiol* 2010;27:955–961.
- Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2004;42:4473–4479.
- Vignaroli C, Zandri G, Aquilanti L, Pasquaroli S, Biavasco F. Multidrug-resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. *Curr Microbiol* 2011;62:1438–1447.
- Wassenberg MW, de Wit GA, van Hout BA, Bonten MJ. Quantifying cost-effectiveness of controlling nosocomial spread of antibiotic-resistant bacteria: The case of MRSA. *PLoS One* 2010;5:e11562.
- Werner G, Hildebrandt B, Klare I, Witte W. Linkage of determinants for streptogramin A, macrolide-lincosamide-streptogramin B, and chloramphenicol resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium* and dissemination of this cluster among streptogramin-resistant enterococci. *Int J Med Microbiol* 2000;290:543–548.
- Wilcks A, Andersen SR, Licht TR. Characterization of transferable tetracycline resistance genes in *Enterococcus faecalis* isolated from food. *FEMS Microbiol Lett* 2005;243:15–19.
- Witte W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: Environment. *Int J Antimicrob Agents* 2000;14:321–325.

Address correspondence to:

Hikmate Abriouel, PhD

Área de Microbiología

Departamento de Ciencias de la Salud

Facultad de Ciencias Experimentales, Edif. B3

Universidad de Jaén

Campus Las Lagunillas s/n

23071-Jaén, Spain

E-mail: hikmate@ujaen.es

## APORTACIÓN 2

**Leyre Lavilla Lerma, Nabil Benomar, Antonio Sánchez Valenzuela, María del Carmen Casado Muñoz, Antonio Gálvez, Hikmate Abriouel. 2014. Role of EfrAB efflux pump in biocide tolerance and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from traditional fermented foods and the effect of EDTA as EfrAB inhibitor. Food Microbiology 44: 249-257.**



# Role of EfrAB efflux pump in biocide tolerance and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from traditional fermented foods and the effect of EDTA as EfrAB inhibitor



Leyre Lavilla Lerma, Nabil Benomar, Antonio Sánchez Valenzuela, María del Carmen Casado Muñoz, Antonio Gálvez, Hikmate Abriouel\*

Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, 23071 Jaén, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 12 January 2014

Received in revised form

15 May 2014

Accepted 11 June 2014

Available online 19 June 2014

### Keywords:

*Enterococcus*

EfrAB efflux pump

Resistance

Biocides

Antibiotics

EDTA

## ABSTRACT

*Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from various traditional fermented foods of both animal and vegetable origins have shown multidrug resistance to several antibiotics and tolerance to biocides. Reduced susceptibility was intra and inter-species dependent and was due to specific and unspecific mechanisms such as efflux pumps. EfrAB, a heterodimeric ABC transporter efflux pump, was detected in 100% of multidrug resistant (MDR) *E. faecalis* strains and only in 12% of MDR *E. faecium* strains. EfrAB expression was induced by half of minimum inhibitory concentration (MIC) of gentamicin, streptomycin and chloramphenicol. However, expression of *efrA* and *efrB* genes was highly dependent on the strain tested and on the antimicrobial used. Our results indicated that 3 mM EDTA highly reduced the MICs of almost all drugs tested. Nevertheless, the higher reductions (>8 folds) were obtained with gentamicin, streptomycin, chlorhexidine and triclosan. Reductions of MICs were correlated with down-regulation of EfrAB expression (10–140 folds) in all three MDR enterococci strains. This is the first report describing the role of EfrAB in the efflux of antibiotics and biocides which reflect also the importance of EfrAB in multidrug resistance in enterococci. EDTA used at low concentration as food preservative could be one of the best choices to prevent spread of multidrug resistant enterococci throughout food chain by decreasing EfrAB expression. EfrAB could be an attractive target not only in enterococci present in food matrix but also those causing infections as well by using EDTA as therapeutic agent in combination with low doses of antibiotics.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Enterococci are normal inhabitants of the gastrointestinal tract (Koch et al., 2004) of humans and many animals (about  $10^7$ /gram of stool) and also in the genitourinary tract, being also present in a variety of foods of animal and vegetable origins, soil and water. Their ubiquitous nature due to the ability to withstand various adverse environmental conditions determines their frequent finding in foods as contaminants being their elimination a

challenging and difficult task. Thus, enterococci have emerged as important nosocomial pathogens with high-level resistance to antibiotics (Murray, 2000). *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are the main enterococci species causing nosocomial infections of about 75 and 20% of the enterococcal-related infections (Conde-Estevéz et al., 2011; Peel et al., 2011) such as urinary tract, endocarditis, bacteremia, catheter-related infections, wound infections, and intra-abdominal and pelvic infections (Koch et al., 2004; Leung et al., 2000; Poh et al., 2006; Svanborg and Godaly, 1997). While some enterococci are known for their pathogenic implications (Edmond et al., 1999; Kayser, 2003; Murray, 1997; Vergis et al., 2001), other species are used as starter cultures in food fermentations (Foulquie Moreno et al., 2006) or as probiotics (Franz et al., 2003) being only some *E. faecium* strains authorized by the European Food Safety Authority (EFSA, 2012) as feed additives.

\* Corresponding author. Present address: Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Edif. B3, Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain. Tel.: +34 953 212003; fax: +34 953 212943.

E-mail address: [hikmate@ujaen.es](mailto:hikmate@ujaen.es) (H. Abriouel).



The high survival capacity exhibited by enterococci in a changing environment with a broad-range of bacteria including non-pathogenic species –especially in food matrix– and their capacity in biofilm formation (Creti et al., 2006; Tendolkar et al., 2006) caused a large exposition to gene exchange such as virulence factors and antibiotic resistance (Eaton and Gasson, 2001; Teuber et al., 2003; Vankerckhoven et al., 2008). Foods of animal origin have been shown to act as reservoir of multiple resistances (Lavilla Lerma et al., 2013; Toomey et al., 2010; Valenzuela et al., 2013; Witte, 2000) to antibiotics which were commonly used in animal husbandry to cure or prevent the onset of bacterial infections and also as growth promoters over decades. Furthermore, multiple resistances were also shown to biocides which were extensively used as disinfectants in food industry. The high-level resistance of enterococci to several antibiotics of clinical importance such as ampicillin, cephalosporins, aminoglycosides, and glycopeptides has been previously reported (Kacmaz and Aksoy, 2005; Murray, 1990) and could be due to intrinsic or acquired mechanisms (Hummel et al., 2007; Klare et al., 2003; Murray, 1990). Multidrug resistance of enterococci of food origin is well documented (Leclercq, 2009; Peters et al., 2003; Vignaroli et al., 2011) and is often associated with the over-expression of efflux pumps which exclude compounds that are structurally and functionally unrelated to prevent the cellular entry of drugs from the cell or the cytoplasmic membrane (Putman et al., 2000). Furthermore, other resistance mechanisms were reported in enterococci including mutational alteration of the target such as the replacement of the second D-Ala residue from peptidoglycan termini by a D-lactate or D-serine (responsible for vancomycin resistance) or the alteration of penicillin-binding proteins (PBPs), and the enzymatic inactivation of drugs (Levine, 2006; Rybkine et al., 1998). The most characterized efflux pumps in enterococci are: EmeA –a member of the major facilitator superfamily (MFS) and a homolog of NorA– (Jonas et al., 2001; Lee et al., 2003a) and EfrAB –belonging to the ATP-binding cassette (ABC) superfamily of multidrug efflux transporters– (Lee et al., 2003b). The ABC multidrug efflux pump EfrAB was detected in *E. faecalis* (Lee et al., 2003b; Valenzuela et al., 2013) but also for the first time in *E. faecium* strains as reported by Valenzuela et al. (2013).

In the present work, we explored the role of EfrAB efflux pump in tolerance/resistance to biocides and antibiotics in MDR *E. faecalis* and *E. faecium* isolated from different traditional fermented foods. Next, we examined the effect of EDTA on EfrAB expression and changes in MICs of different antimicrobials. Inhibition of efflux pump expression is a good alternative to decrease susceptibility of MDR enterococci to commonly used disinfectants and clinical antibiotics. Furthermore, knowledge of antibiotic resistance in enterococci of food origin and their resistance mechanisms is crucial to provide key informations about how to contain the antimicrobial resistance problem in food safety by using different strategies such as inhibitors of efflux pumps mediating resistance to several antimicrobials.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and media

A total of 122 enterococci strains belonging to the species of *E. faecium* and *E. faecalis* were isolated from different traditional fermented foods including fermented milk (Morocco and Spain), meat (Morocco), and vegetable products (Morocco, Spain, and Republic of Congo). Of them, 67 strains were isolated in the present study and 55 strains were isolated by Valenzuela et al. (2008, 2010, 2013) from traditional foods and water used for traditional food preparation. All strains were maintained and stored in brain-heart

infusion (BHI) broth (Scharlab, Barcelona, Spain) containing 20% glycerol at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For routine use, enterococcal strains were cultivated on BHI broth at  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. Identification of *E. faecium* and *E. faecalis* strains

#### 2.2.1. DNA extraction

Total DNA was extracted from cultures by the method described by De los Reyes-Gavilan et al. (1992). This DNA preparation was used in further polymerase chain reactions (PCR).

#### 2.2.2. Species-specific PCR

Presumptive *Enterococcus* sp. were identified at species level by species-specific PCR to detect the *ddlE.faecalis* and *ddlE.faecium* genes as described elsewhere (Abriouel et al., 2005).

### 2.3. Antibiotic and biocide phenotypic susceptibility

The antibiotic susceptibility of enterococci strains was determined by using ATB ENTEROC 5 strips (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) as described elsewhere (Valenzuela et al., 2013). The tests were performed according to the manufacturer's instructions by using the following antibiotics: Ampicillin (AMP), Penicillin (PEN), Erythromycin (ERY), Tetracycline (TET), Chloramphenicol (CMP), Rifampicin (RFA), Ciprofloxacin (CIP), Levofloxacin (LVX), Vancomycin (VAN), Teicoplanin (TEC), Nitrofurantoin (FUR), Gentamycin (GEN), Streptomycin (STR) and Quinupristin/Dalfopristin (QDA). Results were recorded after 24 h of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  and were evaluated according to the manufacturer's instructions.

Regarding disinfectants, the susceptibility of enterococci was assayed against the following biocides: Benzalkonium chloride (BC; Sigma Aldrich), Cetrimide (CE; Sigma Aldrich, USA), Chlorhexidine dihydrochloride (CHX; Sigma Aldrich, US), Hexadecylpyridinium chloride monohydrate (HDP, Sigma Aldrich, USA) and Triclosan (TC; Fluka, Italy). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of biocides was determined in Trypticase Soya Broth (TSB, Scharlab) as described by Fernández-Fuentes et al. (2012). Results were recorded after 24–48 h of incubation by visual reading and optical density (OD 595 nm) determination in an iMark Microplate Reader (BioRad, Madrid, Spain). All susceptibility tests were performed in triplicate and the mean MIC was determined.

### 2.4. PCR amplification for the detection of antibiotic resistance genes

PCR amplification of well-known structural genes of antibiotic resistance: erythromycin (*ermA,B,C*; *mefA,E*; *msrA,B*; and *ereA,B*), tetracycline [*tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(K)* and *tet(L)*] and chloramphenicol (*cat*) was performed as reported by Hummel et al. (2007). PCR of *efrA* and *efrB* genes was done according to Lee et al. (2003b).

### 2.5. Expression of *efrA* and *efrB* genes in MDR enterococci

#### 2.5.1. RNA extraction

The expression of *pheS*, *efrA* and *efrB* genes by MDR enterococci was determined in TSB supplemented with or without the corresponding biocides or antibiotics. Total RNA was isolated from three biological repeats by the Direct-Zol RNA Miniprep (Zymo Research, California, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA quantification and quality assessment were carried out by using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). RNAs were adjusted to a concentration of 500 ng/ $\mu\text{l}$  and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until required.



### 2.5.2. Quantitative real-time PCR of *efrA* and *efrB* genes

For quantitative real-time PCR (qRT-PCR), mRNAs were reverse transcribed into cDNA using the iScript cDNA synthesis kit (Biorad, Madrid, Spain). Phenylalanyl-tRNA synthase alpha-subunit (*pheS*) gene was used as a housekeeping gene and a no template control (NTC) was used as negative control. Primers for the *pheS* housekeeping gene were described by Naser et al. (2005) while the primers for quantitative PCR of *efrA* and *efrB* genes were described in this study: *efrA*qRT-fw (5'-TTGGCTTTATGACGCCAGT-3') and *efrA*qRT-rev (5'-ATGCGCGTATTACCCGCAA-3') for *efrA* gene, and *efrB*qRT-fw (5'-TAGTGATGATGTTCTTAATCAA-3') and *efrB*qRT-rev (5'-ATTGACTTGTTTAAAGCCTTCA-3') for *efrB* gene. Quantitative PCRs (qPCRs) were performed in triplicate on a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System from BioRad using 2 × Power SYBR green chemistry. PCR-grade water served as a negative control.

### 2.6. Effect of different antimicrobials on *EfrAB* efflux pump

To assess the effect of antibiotics and biocides on mRNA expression of *EfrAB*, *E. faecalis* (qE14 and Ac8-2) and *E. faecium* (VP501) strains carrying *EfrAB* efflux pump were treated with different drugs at half of MIC for 24 h (until the bacterial growth reached 0.5–0.6 OD at 595 nm). Following treatment, total mRNA isolation, subsequent cDNA synthesis and quantitative RT-PCR were done as described above. The strains without treatment with drugs served as controls.

### 2.7. Effect of EDTA on *EfrAB* efflux pump

#### 2.7.1. Phenotypic tests

To investigate the effect of ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) on antibiotic and biocide MICs in MDR enterococci, 3 mM EDTA (below the inhibitory concentration of growth determined in MDR enterococci as 5 mM) was added to cultures and the MIC of both antimicrobials (biocides and antibiotics) was determined in TSB as described above.

#### 2.7.2. Effect of EDTA on *EfrAB* expression

To study the effect of EDTA on mRNA of *EfrAB* expression, MDR enterococci positive for *EfrAB* efflux pump were supplemented in TSB with 3 mM EDTA for 24 h. Following treatment, total RNA extraction and quantitative real-time PCR of *efrA* and *efrB* genes were done as described in Section 2.5. Controls without EDTA were used.

#### 2.7.3. Sequencing of *efrA* and *efrB* genes before and after EDTA treatment

With the aim to investigate the effect of EDTA on *EfrAB* at genetic level, MDR enterococci supplemented in TSB with or without 3 mM EDTA for 24 h were subjected to DNA extraction as described above. *EfrAB* encoding regions of MDR enterococci were amplified using the primers described by Lee et al. (2003b). PCR-amplified products were purified using Exo Star kit (GE-Healthcare) and then sequenced bidirectionally with their corresponding primers (Lee et al., 2003b) and also with *efrA*-2F (5'-ATGATGTATCA-GAAGGTG-3') and *efrB*-2F (5'-ATTGTTGACCATGCCCCGA-3'). *EfrA* and *EfrB* deduced amino acid sequences of controls and EDTA-treated MDR enterococci were aligned by using DNASTar CLUSTAL W multiple alignment tool Lasergene programme, version 5.05 (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA).

#### 2.7.4. Nucleotide sequence accession numbers

Nucleotide sequences of *efrA* and *efrB* genes of the selected enterococci strains determined here were deposited in GenBank with the following accession numbers HG970098 to HG970103.

### 2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Student's *t*-test and expressed as means ± standard deviation (SD).

## 3. Results

### 3.1. Biocide susceptibility of *E. faecalis* and *E. faecium* strains

The results obtained showed that all enterococci isolated from fermented foods were inhibited by lower concentrations of the biocide compounds tested such as BC, HDP and CE, with MICs below 0.1 mg/l (Table 1). However, for the guanine CHX, 5.26% of *E. faecalis* strains (qE-14 and Mz4Sth, Table 1) and 36% of *E. faecium* strains (30 strains, Table 1) of different origins were inhibited at 0.25 mg/l, but 16% of *E. faecalis* (AC 5-2, AC 8-2, H<sub>2</sub>O P7, MZ4sth, VP5 02 and YA8, Table 1) and 5% of *E. faecium* strains (AL6, H<sub>2</sub>O P5 03, Tg 6 and YA5, Table 1) required still higher biocide concentration for inhibition (2.5 mg/l). Concerning Triclosan, the MICs of enterococci strains were of 0.1 mg/l for 4% of *E. faecium* strains (H<sub>2</sub>O P3-A, H<sub>2</sub>O P3-B and H<sub>2</sub>O P5, Table 1), 0.2 mg/l for 10.53% and 42% of *E. faecalis* (H<sub>2</sub>O P7, PE1-1, VP5 02 and YA8) and *E. faecium* (35 strains, Table 1) strains respectively, and 0.25 mg/l for 5.26% of *E. faecalis* strains (AC5-2 and AC8-2) and 13.1% of *E. faecium* strains (AC5-1, AC6-1, AC8-1, AC10-1, AC11-1, AC12-1, C2-3, H<sub>2</sub>O P5 03, KAA1, KAA3 and KAA4, Table 1).

### 3.2. Antibiotic susceptibility and selection of MDR *E. faecalis* and *E. faecium*

On the basis of the phenotypic resistance profile of *E. faecium* and *E. faecalis* strains to chlorhexidine and triclosan, antibiotic susceptibility of resistant strains was evaluated (Fig. 1, Table 2) in this study and also by Valenzuela et al. (2010, 2013) as described previously. The incidence of phenotypic antibiotic resistance amongst biocide-tolerant enterococci was highly dependent on the species analyzed (Fig. 1), so 87.5% of *E. faecalis* strains showed phenotypic resistance to rifampicin (RFA), 50% to quinupristin/dalfopristin (QDA) and 37.5% to ciprofloxacin (CIP) and erythromycin (ERY). However, the most important antibiotics to which *E. faecium* strains showed phenotypic resistance were RFA (57.5%), ERY (55.3%), CIP (29.8%), levofloxacin (LVX) (25.5%) and nitrofurantoin (FUR) (21.2%). Concerning the food origin of isolation, biocide-tolerant enterococci exhibited phenotypic resistance to all antibiotics mentioned above being isolated from different fermented foods (vegetable, meat and fish products) and water.

Considering the phenotypic resistance of all strains, MDR enterococci were detected in 50% and 35% of *E. faecalis* and *E. faecium* strains, respectively. However the genotypic resistance detected by PCR (Table 2) indicated that such resistance determinants such as *ermB*, *tetM*, *tetL*, *cat*, *msrA/B* and *efrA/B* were only present in some strains. Nevertheless, Table 2 showed clearly that all *E. faecalis* strains with tolerance to chlorhexidine/triclosan or both exhibited the presence of *efrA* and *efrB* efflux pump (8 strains, 100%), while only 6 out of 49 (12%) *E. faecium* strains showed the presence of this efflux pump.

### 3.3. Effect of different drugs on expression of *EfrAB* efflux pump in *E. faecalis* and *E. faecium*

We determined the effect of different antimicrobials (antibiotics or biocides) on the expression of *efrA* and *efrB* genes coding for *EfrAB* efflux pump in MDR enterococci strains. In general, no effects were observed following treatment with most drugs in different MDR enterococci (Fig. 2). However, significant changes in mRNA

**Table 1**  
Minimum inhibitory concentrations of biocides against enterococcal isolates from foods.

Biocide	<i>E. faecalis</i> strains with MIC's of (in mg/l)					<i>E. faecium</i> strains with MIC's of (in mg/l)				
	0.1	0.2	0.25	2.5	5	0.1	0.2	0.25	2.5	5
Benzalkonium chloride	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hexadecylpyridinium chloride	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chlorhexidine	0	0	qE14, MZ4KAA	AC5-2, AC8-2, H <sub>2</sub> O P7, MZ4sth, VP5 02, YA8	0	0	0	AC 5-1, AC 6-1, AC10-1, AC 11-1, AC 12-1, AL 2, AL 3, AL 4, CH 1-2, H <sub>2</sub> O P5 01, H <sub>2</sub> O P8-A, LA 1-2, M 2-2, PE 2-1, PE 2-2, PEF 2-2, Sln 1, Sln 2, KAA 1, KAA 3, VP3 01, VP3 02, VP5 01, VP5 03, YA 2, YA 6, YA 7, YA 9-A, YA 9-B, YA 10	AL6, H <sub>2</sub> O P5 03, Tg6, YA5	0
Cetrimide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Triclosan	0	H <sub>2</sub> O P7, PE1-1, VP5 02, YA8	AC8-2, AC5-2	0	0	H <sub>2</sub> O P3-A, H <sub>2</sub> O P3, H <sub>2</sub> O P5	AL 2, AL 3, AL 4, AL 6, CH 1-2, CHG 2-1, CHG 2-2, CHG 2-3, H <sub>2</sub> O P501, H2O P8-A, KAA 2, KAA entC, LA 1-2, M2-1, M2-2, PE 1-2, PE 2-1, PE 2-2, PE 3-2, PEF 2-2, Sln 1, Sln 2, Sln entC, Tg6, VP3 01, VP3 02, VP5 01, VP5 03, YA 2, YA 5, YA 6, YA 7, YA 9-A, YA 9-B, YA 10	AC5-1, AC6-1, AC8-1, AC10-1, AC11-1, AC12-1, C2-3, H <sub>2</sub> O P5 03, KAA 1, KAA 3, KAA 4	0	0

levels were detected in gentamicin and streptomycin treated *E. faecalis* Ac 8-2 (Fig. 2A), gentamicin treated *E. faecalis* qE-14 (Fig. 2B) and chloramphenicol treated *E. faecium* VP5 01 (Fig. 2C) increasing the expression levels of *efrA* and *efrB* genes by 2–3 folds compared to the corresponding controls (Fig. 2). On the other hand, triclosan decreased the expression of *efrA* and *efrB* genes by 2.3 and 1.9 folds, respectively in *E. faecalis* Ac 8-2 (Fig. 2A).

### 3.4. Effect of EDTA on EfrAB activity

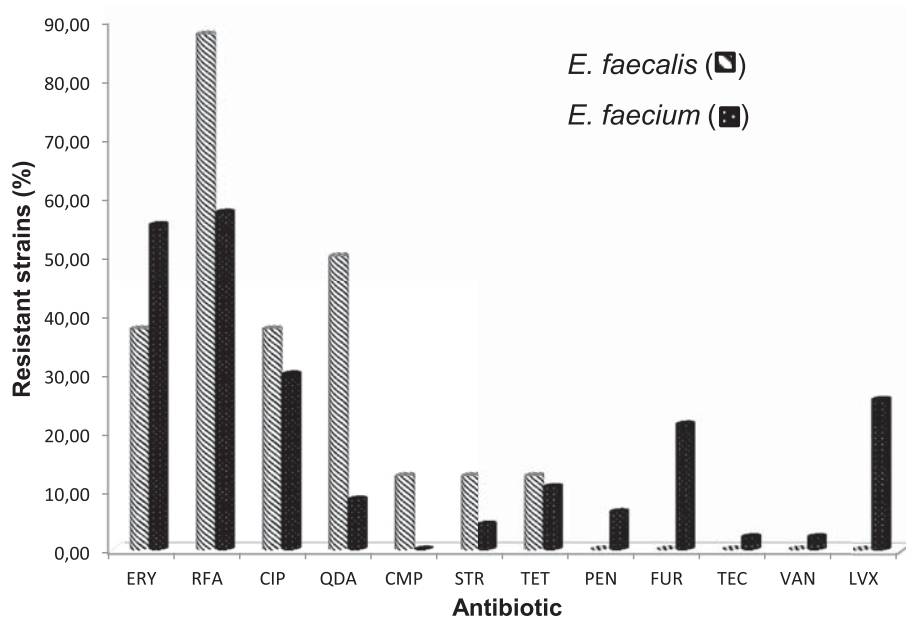
#### 3.4.1. Effect of EDTA on MIC

The addition of 3 mM EDTA to all three MDR enterococci resulted generally in a decrease in MIC values of different

antimicrobials tested in this study (Table 3). The results indicated that MICs of antibiotics and biocides decreased by 2–3500 and 10–>100 folds, respectively in the presence of EDTA. Furthermore, in some cases some antimicrobials (erythromycin and both biocides) at very low concentration in combination with 3 mM EDTA produced growth inhibition of MDR enterococci (Table 3).

#### 3.4.2. Effect of EDTA on EfrAB expression

Our results revealed that treatment with 3 mM EDTA caused a decrease in antibiotic and biocide MICs. In an attempt to understand if EDTA had an inhibitory effect on EfrAB efflux pump in MDR enterococci or only had a synergistic effect with different antimicrobials (antibiotics or biocides), RNA expression levels of *efrA* and



**Fig. 1.** Incidence of antibiotic resistance in MDR *E. faecalis* (▨) and *E. faecium* (■) isolated from traditional fermented foods.

**Table 2**

Incidence of antibiotic resistance in biocide-tolerant enterococcal isolates from different foods.

Isolate	Food source	Antibiotic resistance (identified resistance determinants)	Biocide tolerance
<i>E. faecalis</i> Ac 5-2	Olives	ERY, RFA ( <i>ermB</i> , <i>msrA</i> , <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )	CH, TC
<i>E. faecalis</i> Ac 8-2	Olives	CIP, QDA, RFA** ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )	CH, TC
<i>E. faecalis</i> Mz4 sth	Cow meat salami	CIP, QDA, RFA** ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )	CH
<i>E. faecalis</i> H <sub>2</sub> O P7	Water	ERY, RFA, TET ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> , <i>tetM</i> , <i>tetL</i> )	CH, TC
<i>E. faecalis</i> qE14	Cheese	ERY, CMP, QDA, RFA, STR, TET** ( <i>ermB</i> , <i>cat</i> , <i>efrA</i> , <i>efrB</i> , <i>tetM</i> )	CH
<i>E. faecalis</i> PE1-1	Fish	QDA ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )	TC
<i>E. faecalis</i> VP5 02	Palm wine	RFA ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )	CH, TC
<i>E. faecalis</i> YA8	Fermented milk	CIP, RFA ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> AC5-1	Olives	ERY, PEN, RFA	CH, TC
<i>E. faecium</i> AC6-1	Olives	ERY, PEN, RFA	CH, TC
<i>E. faecium</i> AC8-1	Olives	ERY, RFA	TC
<i>E. faecium</i> AC10-1	Olives	ERY, RFA ( <i>ermB</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> AC11-1	Olives	ERY, PEN, RFA ( <i>ermB</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> AC12-1	Olives	ERY, RFA	CH, TC
<i>E. faecium</i> AL2	Fish	RFA	CH, TC
<i>E. faecium</i> AL3	Fish	RFA	CH, TC
<i>E. faecium</i> AL4	Fish	RFA	CH, TC
<i>E. faecium</i> AL6	Fish	RFA	CH, TC
<i>E. faecium</i> C2-3	Fish	RFA, FUR	TC
<i>E. faecium</i> CH 1-2	Fish	ERY, FUR	TC
<i>E. faecium</i> CHG 2-1	Fish	ND	TC
<i>E. faecium</i> CHG 2-2	Fish	ERY, FUR	TC
<i>E. faecium</i> CHG 2-3	Fish	ERY	TC
<i>E. faecium</i> LA 1-2	Fish	ND	CH, TC
<i>E. faecium</i> M2-1	Fish	ERY	TC
<i>E. faecium</i> M2-2	Fish	ERY, FUR	CH, TC
<i>E. faecium</i> PE 1-2	Fish	ND ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )	TC
<i>E. faecium</i> PE 2-1	Fish	FUR, RFA	CH, TC
<i>E. faecium</i> PE 2-2	Fish	CIP, FUR, LVX, RFA*	CH, TC
<i>E. faecium</i> PE 3-2	Fish	ERY, FUR	TC
<i>E. faecium</i> PEF 2-2	Fish	ERY	CH, TC
<i>E. faecium</i> KAA entC	Fish	ND	TC
<i>E. faecium</i> Sln entC	Fish	FUR, RFA	TC
<i>E. faecium</i> H <sub>2</sub> O P3-A	Water	ND	TC
<i>E. faecium</i> H <sub>2</sub> O P3	Water	ERY, QDA, RFA, TEC, VAN** ( <i>msrA/B</i> , <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )	TC
<i>E. faecium</i> H <sub>2</sub> O P5	Water	ND	TC
<i>E. faecium</i> H <sub>2</sub> O P5 01	Water	ND	CH, TC
<i>E. faecium</i> H <sub>2</sub> O P5 03	Water	ERY, RFA ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> H <sub>2</sub> O P8-A	Water	ND	CH, TC
<i>E. faecium</i> YA 2	Fermented milk	CIP, ERY, LVX, QDA, RFA** ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> YA 5	Fermented milk	QDA, RFA ( <i>efrA</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> YA 6	Fermented milk	CIP, ERY, LVX** ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> YA 7	Fermented milk	ERY, RFA	CH, TC
<i>E. faecium</i> YA 9-A	Fermented milk	CIP, ERY, LVX** ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> YA 9-B	Fermented milk	CIP, ERY, LVX** ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> YA 10	Fermented milk	ERY, RFA ( <i>ermB</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> KAA 1	Blood sausage	CIP, ERY, FUR, STR, TET** ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> , <i>tetM</i> , <i>tetL</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> KAA 2	Blood sausage	CIP, LVX	TC
<i>E. faecium</i> KAA 3	Blood sausage	CIP, FUR, LVX, RFA, STR, TET** ( <i>tetM</i> , <i>tetL</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> KAA 4	Blood sausage	CIP, ERY, LVX, RFA, TET** ( <i>msrA/B</i> , <i>ermB</i> )	TC
<i>E. faecium</i> Sln 1	Blood sausage	CIP, LVX, RFA, TET** ( <i>tetM</i> , <i>tetL</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> Sln 2	Blood sausage	CIP, FUR, LVX, TET** ( <i>tetL</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> Tg6	Ginger beer	CIP, ERY, QDA, RFA** ( <i>msrA/B</i> , <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> VP3 01	Palm wine	CIP, ERY, LVX, RFA** ( <i>msrA/B</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> VP3 02	Palm wine	CIP, LVX, RFA**	CH, TC
<i>E. faecium</i> VP5 01	Palm wine	ERY, RFA ( <i>efrA</i> , <i>efrB</i> )	CH, TC
<i>E. faecium</i> VP5 03	Palm wine	ND	CH, TC

ND: no resistance was detected.

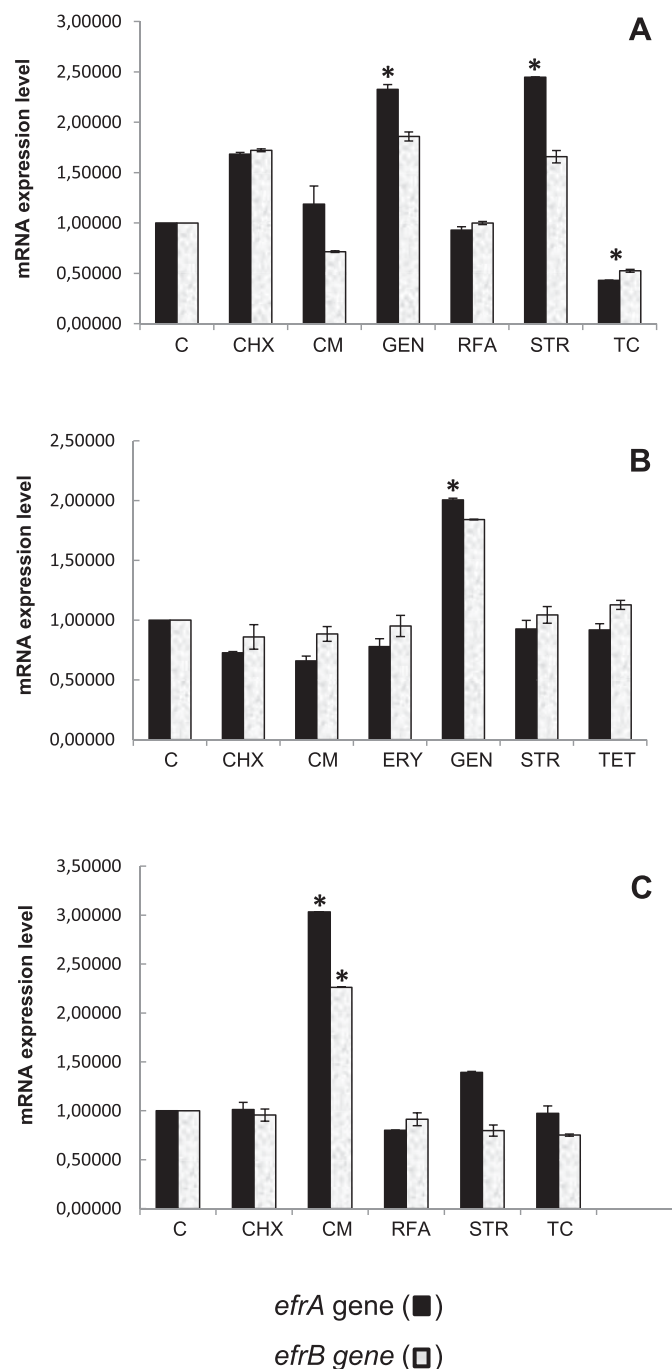
\* and \*\*: Antibiotic resistance phenotypes and molecular determinants were determined by Valenzuela et al. (2010, 2013), respectively.

CIP, ciprofloxacin; CHX, chlorhexidine; CMP, chloramphenicol; ERY, erythromycin; FUR, nitrofurantoin; GEN, gentamycin; LVX, levofloxacin; QDA, quinupristine; RFA, rifampicin; STR, streptomycin; TC, triclosan; TEC, teicoplanin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin.

*efrB* genes coding for EfrAB efflux pump were quantified in the presence and absence of EDTA. The results obtained showed that the expression of both *efrA* and *efrB* genes coding for EfrAB efflux pump was highly inhibited in the presence of 3 mM EDTA regardless the enterococci strain used (Fig. 3). In all cases, the down-regulation of the expression of EfrAB efflux pump caused by EDTA was more remarkable in *E. faecalis* qE-14 with 140 fold reductions as compared with the control without EDTA (Fig. 3).

### 3.4.3. Molecular effects of EDTA on *efrA* and *efrB* genes

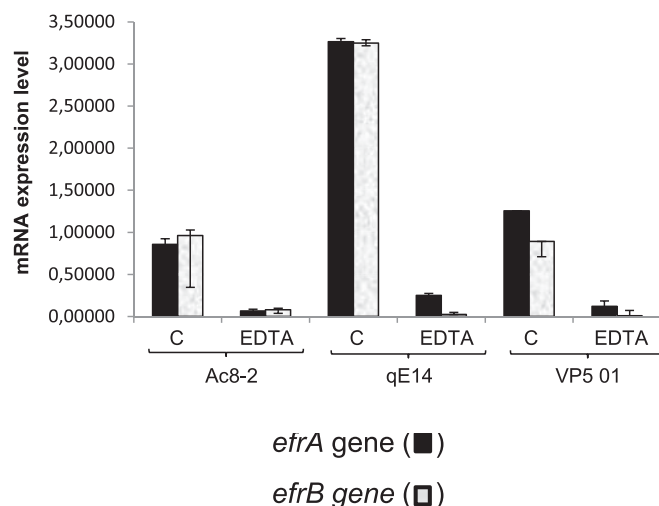
Analysis on *efrA* and *efrB* gene sequences showed 99.4–99.6% of homology with those of *E. faecalis* deposited in database, however deduced amino acid sequences of EfrA and EfrB proteins were 100% identical (data not shown). Furthermore, analysis of the deduced amino acid sequences of EfrA and EfrB proteins before and after treatments with EDTA showed that no mutation occurred after EDTA treatment in all MDR enterococci studied.



**Fig. 2.** Effect of half minimum inhibitory concentration (MIC) of different drugs on the expression of EfrAB efflux pump genes (*efrA* “solid bars” and *efrB* “gray bars”) in *E. faecalis* Ac8-2 (A), *E. faecalis* qE-14 (B) and *E. faecium* VP5 01 (C). The following drugs were used: CHX, chlorhexidine; CM, chloramphenicol; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; RFA, rifampicin; STR, streptomycin; TC, triclosan and TET, tetracycline.

#### 4. Discussion

Reduced susceptibility to disinfectants (such as chlorhexidine and triclosan) and antibiotics among bacteria is due to specific and unspecific mechanisms which often involves the action of active or over-expressed efflux pumps (Poole, 2005). *E. faecalis* is a highly stress resistant opportunistic pathogen able to colonize the hostile environments and to resist to several antimicrobials. The remarkable intrinsic ruggedness of *E. faecalis* is partially due to the



**Fig. 3.** Effect of EDTA on expression of *efrA* (solid bars) and *efrB* (gray bars) genes in MDR *E. faecalis* (Ac8-2 and qE-14 strains) and *E. faecium* (VP5 01 strain).

presence of multidrug resistance efflux pumps such as EmeA which belongs to the major facilitator superfamily (MFS) and the ABC-type multidrug resistance transporters (Jonas et al., 2001; Lee et al., 2003a). Among multidrug resistance ABC transporters, EfrAB is a heterodimeric ABC transporter, being elevated drug resistance was only observed when *efrA* and *efrB* genes were coexpressed (Lubelski et al., 2007). Few studies showed that the established substrates for EfrAB efflux pump were several toxic compounds such as acriflavine, ethidium bromide, safranin O, DAPI, daunomycin, doxorubicin, novobiocin, arbekacin, doxycycline and norfloxacin (Davis et al., 2001; Lubelski et al., 2007) in *E. faecalis*. However, EfrAB was also detected in *E. faecium* isolated from fermented foods as reported for the first time by Valenzuela et al. (2013). In the present study, the incidence of antibiotic and biocide resistance/tolerance was highly dependent on the species analyzed and only some MDR enterococci exhibited resistance determinants such as *efrA/B* (100% and 12% of *E. faecalis* and *E. faecium* strains, respectively). With the aim to elucidate if EfrAB was implicated in antibiotic and/or biocide resistance/tolerance, we investigated the expression levels of EfrAB in the presence of different drugs. The results obtained in this study indicated that the expression of EfrAB was highly dependent on the bacterial strain and also on the drug used. In this context, some antibiotics at half of MIC increased the expression of *efrA* and *efrB* coding genes for EfrAB efflux pump such as gentamicin or streptomycin in *E. faecalis* Ac 8-2, gentamicin in *E. faecalis* qE-14 and chloramphenicol in *E. faecium* VP5 01, which suggested that *efrAB* expression was induced by the mentioned antibiotics. In this

**Table 3**

Effect of 3 mM EDTA on MIC fold reduction of different drugs in MDR enterococci.

Strains	Fold reduction in MIC							
	CMP	ERY	GEN	RFA	STR	TET	CHX	TC
<i>E. faecalis</i> Ac 8-2	4	S	16	1	8	>4	S	S
<i>E. faecalis</i> qE-14	2	1	3500	1	6	4	S	S
<i>E. faecium</i> VP5 01	4	S	32	4	32	2	10	100

S: sensitive to the corresponding antimicrobial at very low concentration used (>100 folds).

The antimicrobials used in the current study are: CMP, chloramphenicol; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; RFA, rifampicin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; CHX, chlorhexidine; TC, triclosan.



sense, we can suggest that *efrAB* was involved in the efflux of chloramphenicol, gentamicin and streptomycin in the corresponding bacteria and consequently the emergence of resistance to such antibiotics could occur. However, no phenotypic resistance was reported in those strains to the corresponding antibiotics being other mechanisms involved to enhance their susceptibility to the mentioned antibiotics. On the other hand, mRNA expression of *EfrAB* was found to be decreased significantly with triclosan in *E. faecalis* Ac 8-2 which could be occurred for several reasons such as the disturbance of the regulatory pathway essential for expression of the efflux pump, alteration of the structure of efflux pump components, or disturbance of energy essential for pump activity as occurred in Gram-negative bacteria with other antimicrobials (Poole and Lomovskaya, 2006; Pagès and Amaral, 2009). Triclosan is a phenolic compound used in many everyday products including toothpaste, soaps, and lotions (Nester et al., 2007) to inhibit bacterial growth by the inhibition of enoyl-ACP-reductase involved in bacterial fatty acid synthesis. This interaction may cause the disruption of bacterial cell membrane integrity and thus inhibition of growth (Ellison and Champlin, 2007). Data obtained in the present study indicated that *EfrAB* was inhibited by triclosan which interact with enoyl-reductase associated membrane and causes the disorganization of membrane, and thus the hindrance of assembly of *EfrAB* efflux pump components could occur. This fact was only observed in *E. faecalis* Ac 8-2 but not in *E. faecium*. Thus, the observed decreased susceptibility to triclosan in *E. faecalis* Ac 8-2 could imply other mechanisms than *EfrAB* to pump out triclosan. Rational use of antiseptics such as triclosan could also have a positive effect on prevention of antimicrobial resistance/tolerance by reducing the expression of *EfrAB* efflux pump and consequently decreasing the antibiotic selective pressure caused by the use of systemic antibiotics. Considering the membrane organization and structure which are inherently dependent on the bacterial strain, the effect of antimicrobials targeting specific molecules depends highly on the strain tested. Those data revealed clearly that the interaction of drug with *EfrAB* efflux pump is strain specific, so in a complex food matrix different interactions may occur and the balance of such interactions reflect the resistance panorama observed in foodborne bacteria.

On the other hand, in the present study we explored the effect of EDTA on *EfrAB* efflux pump and subsequent changes in antimicrobial susceptibility and expression. Our data revealed that the addition of a non-inhibitory concentration of EDTA (3 mM) reduced the MICs of almost all drugs used (antibiotics or biocides). Higher reductions of MICs were observed with gentamicin, streptomycin, chlorhexidine and triclosan in the presence of 3 mM EDTA. This reduction may be due to the synergistic effect of different drugs and EDTA since 3 mM EDTA alone did not cause any inhibition. EDTA is a chelating agent of divalent cations of the outer membrane of Gram-negative bacteria, and has also a little effect on Gram-positive bacteria but without increasing their susceptibility to antimicrobial agents (Russel and Furr, 1977). EDTA sequesters divalent cations, which are essential nutrients for bacterial cells and for maintenance of cell structures (like the outer cell membrane in Gram-negative bacteria). Thus, scarcity of divalent cations may affect several cellular processes, including efflux activity and others. Since the levels of expression of antibiotic resistance may depend on the physiological state of the cell, cells stressed by other factors such as decreased availability of divalent cations could possibly be impaired not only in their efflux activity (resulting in accumulation of higher antibiotic concentrations in the cytoplasm) but also in the levels of gene expression/regulation making them more sensitive to antimicrobials to which they are resistant under normal physiological conditions.

Sequestration of divalent cations by EDTA may impair *EfrAB* efflux pump functions. Furthermore, the binding capacity of EDTA to proteins of an ABC-type transporter was previously shown by Zhang et al. (2007). One probable reason for the reduced MICs observed in our study could be the inactivation of *EfrAB* efflux pump by EDTA (as efflux pump inhibitor), so the accumulation of drug may occur within the bacterial cells which in turn lead to impairment of cellular functions, including possibly the inhibition of *EfrAB* gene expression. To confirm this hypothesis, mRNA expression was done in the same conditions and the data obtained showed that EDTA caused significant changes in *EfrAB* expression in all enterococci strains tested. EDTA highly inhibited *EfrAB* expression in all *E. faecalis* and *E. faecium* strains tested, so *EfrA* and *EfrB* exhibited 10–140 fold down-regulation in the gene expression with 3 mM EDTA. The down-regulation of the *EfrAB* mRNA expression following treatment with EDTA occurred in a dose dependent manner from 1 to 3 mM (data not shown), however the best results were obtained with 3 mM EDTA. EDTA is a widely used chemical as food preservative due to its GRAS (Generally Recognized As Safe) status approved by Food and Drug Administration (FDA) since 1998 (FDA, 1998), also it is used in personal care, skin care, cosmetic preparations, and in medical, engineering, agricultural and industrial applications as well. The down-regulation of *EfrAB* expression in the presence of EDTA is mainly responsible of MIC reduction of almost all antimicrobials tested in this study at neutral pH. The effect of pH on the cell envelope, its constituents, genes that regulate growth and metabolism has been largely reported in several studies, however the effect of EDTA on *EfrAB* efflux pump expression in milieus of acidic pHs was not studied since EDTA at acidic pH (pH 5) caused a complete growth inhibition of all enterococci strains (data not shown). Furthermore, *EfrAB* showed energy-dependent efflux rather than pH as reported by Lee et al. (2003b) for *EfrAB* in *E. faecalis* and Martins et al. (2011) for *MsbA* (an ABC transporter similar to *EfrAB*) in *Escherichia coli*. Consequently, we can confirm that *EfrAB* efflux pump is generally implicated in the efflux of different antibiotics and biocides (CMP, ERY, GEN, RFA, STR, TET, CHX and TC) in enterococci isolated from fermented foods, however intra- and inter-species differences were detected because of the membrane organization and composition of each strain. Furthermore, the results obtained in this study corroborate also the importance of *EfrAB* in multidrug-resistance in foodborne enterococci strains.

Therefore, it is reasonable to suggest that the use of EDTA at lower concentration (3 mM) should be evaluated in foods to avoid the emergence of resistance to clinically relevant antibiotics mediated by different efflux pumps as occurred in the current study with *EfrAB* in MDR enterococci isolated from fermented foods. The presence of EDTA enhanced susceptibility to several antibiotics and biocides to which enterococci strains were resistant such as chloramphenicol and tetracycline in *E. faecalis* qE-14, and erythromycin and rifampicin in *E. faecium* VP5 01. Furthermore, recent studies (Chaudhary and Payasi, 2012; Chaudhary et al., 2012) indicated that EDTA as efflux pump inhibitor enhanced the susceptibility of *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains to several antibiotics by inhibiting AcrAB-TolC and MexA-MexB-OprM efflux pumps, respectively. This fact encourage the use of EDTA -at concentration regarded as safe- not only in food industry (maximum permissible levels of EDTA in foods is of 800 ppm which is almost equivalent to 3 mM tested in this study; Food and Drug Administration “<http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm091048.htm>”) but also in clinical infections (EDTA up to 3.33 mg/kg body weight corresponding to 12 mM is safe to human when administered intravenously; Chaudhary et al., 2012) to avoid or minimize further development of multidrug resistant strains.

## 5. Conclusions

The data obtained in the present study indicate that EfrAB pump expression is induced by some antibiotics in MDR enterococci isolated from fermented foods which could lead to resistance. Furthermore, EfrAB expression was highly dependent on the enterococcal strain and also on the drug used, being involved in the efflux of several antibiotics and biocides. To enhance susceptibility of MDR enterococci, EDTA was used at sub-inhibitory concentration of 3 mM as efflux pump inhibitor down-regulating EfrAB efflux pump and thus allowing higher decrease in MICs of different drugs. These results presents new findings of the correlation between the level of expression of the *efrA/B* genes and MIC reduction of different antibiotics and biocides in the presence of 3 mM EDTA. This may be a good alternative since EDTA is used as food preservative which could prevent antimicrobial resistance by reducing the expression of EfrAB efflux pump and consequently decrease the antibiotic selective pressure caused by the use of systemic antibiotics and disinfectants.

## Acknowledgments

This work was supported by grants AGL2009-08921, P08-AGR-4295, Plan propio de la Universidad de Jaén, and Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario CeiA3. Leyre Lavilla Lerma was beneficiary of a fellowship from Spanish Ministry of Education and Science.

## References

- Abriouel, H., Lucas, R., Ben Omar, N., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A., 2005. Enterocin AS-48Rj: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by the food isolate *Enterococcus faecium* RJ16. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 383–397.
- Chaudhary, M., Payasi, A., 2012. Ethylenediaminetetraacetic acid: a non antibiotic adjuvant enhancing *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6, 6799–6804.
- Chaudhary, M., Kumar, S., Payasi, A., 2012. A novel approach to combat acquired multiple resistance in *Escherichia coli* by using EDTA as efflux pump inhibitor. *J. Microb. Biochem. Technol.* 4, 126–130.
- Conde-Estevez, D., Grau, S., Albanell, J., Terradas, R., Salvado, M., Knobel, H., 2011. Clinical characteristics and outcomes of patients with vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* bacteraemia in cancer patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 103–108.
- Creti, R., Koch, S., Fabretti, F., Baldassarri, L., Huebner, J., 2006. Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides. *BMC Microbiol.* 6, 60.
- Davis, D.R., McAlpine, J.B., Pazoles, C.J., Talbot, M.K., Alder, E.A., White, C., Jonas, B.M., Murray, B.E., Weinstock, G.M., Rogers, B.L., 2001. *Enterococcus faecalis* multidrug resistance transporters: application for antibiotic discovery. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 179–184.
- De los Reyes-Gavilan, C.G., Limsowtin, G.K.Y., Tailliez, P., Séchaud, L., Acholas, J.P., 1992. A *Lactobacillus helveticus*-specific DNA probe detects restriction fragment length polymorphisms in this species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3429–3432.
- Eaton, T.J., Gasson, M.J., 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1628–1635.
- Edmond, M.B., Wallace, S.E., McClish, D.K., Pfaller, M.A., Jones, R.N., Wenzel, R.P., 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin. Infect. Dis.* 29, 239–244.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.* 10, 2740 (Available online: [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu)).
- Ellison, M.L., Champlin, F.R., 2007. Outer membrane permeability for nonpolar antimicrobial agents underlies extreme susceptibility of *Pasteurella multocida* to the hydrophobic biocide triclosan. *Vet. Microbiol.* 124, 310–318.
- FDA Food and Drug Administration, 1998. Food Additive Safety Profiles of Tetrasodium EDTA, Disodium EDTA, Calcium Disodium EDTA, and Dipotassium EDTA. FDA Database. FDA, Washington, DC.
- Fernández-Fuentes, M.A., Ortega Morente, E., Abriouel, H., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., 2012. Isolation and identification of bacteria from organic foods: sensitivity to biocides and antibiotics. *Food Control* 26, 73–78.
- Foulquie Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food. Microbiol.* 106, 1–24.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H., 2003. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 105–122.
- Hummel, A.S., Hertel, C., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., 2007. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 730–739.
- Jonas, B.M., Murray, B.E., Weinstock, G.M., 2001. Characterization of *emeA*, a NorA homolog and multidrug resistance efflux pump, in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3574–3579.
- Kacmaz, B., Aksoy, A., 2005. Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25, 535–538.
- Kayser, F.H., 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 255–262.
- Klare, I., Konstabel, C., Badstubner, D., Werner, G., Witte, W., 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 269–290.
- Koch, S., Huftagel, M., Theilacker, C., Huebner, J., 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 22, 822–830.
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A., Abriouel, H., 2013. Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *Int. J. Food Microbiol.* 161, 97–106.
- Leclercq, R., 2009. Epidemiological and resistance issues in multidrug resistant staphylococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 224–231.
- Lee, E.W., Chen, J., Huda, M.N., Kuroda, T., Mizushima, T., Tsuchiya, T., 2003a. Functional cloning and expression of *emeA*, and characterization of *EmeA*, a multidrug efflux pump from *Enterococcus faecalis*. *Biol. Pharm. Biol.* 26, 266–270.
- Lee, E.W., Huda, M.N., Kuroda, T., Mizushima, T., Tsuchiya, T., 2003b. EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3733–3738.
- Leung, J.W., Liu, Y.L., Desta, T.D., Libby, E.D., Inciardi, J.F., Lam, K., 2000. *In vitro* evaluation of antibiotic prophylaxis in the prevention of biliary stent blockage. *Gastrointest. Endosc.* 51, 296–303.
- Levine, D.P., 2006. Vancomycin: a history. *Clin. Infect. Dis.* 42, S5–S12.
- Lubelski, J., Konings, W.N., Driessen, A.J., 2007. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 463–476.
- Martins, A., Machado, L., Costa, S., Cerca, P., Spengler, G., Viveiros, M., Amaral, L., 2011. Role of calcium in the efflux system of *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 37, 410–414.
- Murray, B.E., 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 46–65.
- Murray, B.E., 1997. Vancomycin – resistant enterococci. *Am. J. Med.* 101, 284–293.
- Murray, B.E., 2000. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N. Engl. J. Med.* 342, 710–721.
- Naser, S.M., Thompson, F.L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., Swings, J., 2005. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology* 151, 2141–2150.
- Nester, E.W., Anderson, D.G., Roberts Jr., C.E., Nester, M.T., 2007. *Microbiology: a Human Perspective*, fifth ed. McGraw, Boston.
- Pagès, J.-M., Amaral, L., 2009. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 826–833.
- Peel, T., Cheng, A.C., Spelman, T., Huysmans, M., Spelman, D., 2011. Differing risk factors for vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococcal bacteraemia. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 388–394.
- Peters, J., Mac, K., Wichmann-Schauer, H., Klein, G., Ellerbroek, L., 2003. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 311–314.
- Poh, C.H., Oh, H.M.L., Tan, A.L., 2006. Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteraemia in an acute care hospital. *J. Infect.* 52, 383–386.
- Poole, K., 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 20–51.
- Poole, K., Lomovskaya, O., 2006. Can efflux inhibitors really counter resistance? *Infect. Dis.* 3, 145–152.
- Putman, M., van Veen, H.W., Konings, W.N., 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 672–693.
- Russel, A.D., Fur, J.R., 1977. Antibacterial activity of a new chloroxylenol preparation containing ethylenediamine tetra acetic acid. *J. Appl. Bacteriol.* 43, 253–260.
- Rybkin, T., Mainardi, J.L., Sougakoff, W., Collatz, E., Gutmann, L., 1998. Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of  $\beta$ -lactam resistance. *J. Infect. Dis.* 178, 159–163.
- Svanborg, C., Godaly, G., 1997. Bacterial virulence in urinary tract infection. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 11, 513–529.
- Tendolkar, P.M., Baghdadyan, A.S., Shankar, N., 2006. Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 188, 2063–2072.
- Teuber, M., Schwarz, F., Perreten, V., 2003. Molecular structure and evolution of the conjugative multiresistance plasmid pRE25 of *Enterococcus faecalis* isolated from a raw-fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 325–329.
- Toomey, N., Bolton, D., Fanning, S., 2010. Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Res. Microbiol.* 161, 127–135.
- Valenzuela, A.S., Omar, N.B., Abriouel, H., López, R.L., Ortega, E., Cañamero, M.M., Gálvez, A., 2008. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco:

- determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2648–2652.
- Valenzuela, A.S., Benomar, N., Abriouel, H., Cañamero, M.M., Gálvez, A., 2010. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiol.* 27, 955–961.
- Valenzuela, A.S., Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A., Pérez Pulido, R., Abriouel, H., 2013. Phenotypic and molecular antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from different traditional fermented foods. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 143–149.
- Vankerckhoven, V., Huys, G., Vancanneyt, M., Snauwaert, C., Swings, J., Klare, I., Witte, W., Van Autgaerden, T., Chapelle, S., Lammens, C., Goossens, H., 2008. Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4247–4255.
- Vergis, E.N., Hayden, M.K., Chow, J.W., Snyderman, D.R., Zervos, M.J., Linden, P.K., Wagener, M.M., Schmitt, B., Muder, R.R., 2001. Determinants of vancomycin resistance and mortality rates in enterococcal bacteremia. *Ann. Intern. Med.* 135, 484–492.
- Vignaroli, C., Zandri, G., Aquilanti, L., Pasquaroli, S., Biavasco, F., 2011. Multidrug-resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. *Curr. Microbiol.* 62, 1438–1447.
- Witte, W., 2000. Selective pressure by antibiotic use in livestock. *Int. J. Antimicrob. Agents* 16, S19–S24.
- Zhang, H., Herman, J.P., Bolton, H., Zhang, Z., Clark, S., Xun, L., 2007. Evidence that bacterial ABC-type transporter imports free EDTA for metabolism. *J. Bacteriol.* 189, 7991–7997.

DISCUSIÓN GENERAL



Los antimicrobianos químicos han sido ampliamente usados para la limpieza y desinfección de superficies en la industria alimentaria, lo que implica un elevado riesgo para la seguridad alimentaria. Esto se debe a que los microorganismos pueden desarrollar diversos mecanismos de resistencia a los desinfectantes y detergentes utilizados habitualmente en los procedimientos estandarizados de limpieza y desinfección. En este sentido, varios factores pueden reducir el efecto de los desinfectantes tales como la presencia de la materia orgánica que actúa como protectora de la bacteria (Peyrat *et al.*, 2008), el crecimiento en forma de biopelículas o la adaptación de la bacteria derivada de la exposición a dosis sub-letales del antimicrobiano. Además, los alimentos pueden proporcionar un excelente ambiente para el crecimiento microbiano, tanto en la propia matriz del alimento como en las superficies de los equipos usados para la manipulación y procesamiento de los alimentos. De hecho, las superficies de los equipos son consideradas una importante fuente de contaminación microbiana y re-contaminación de los alimentos, lo que incrementa las oportunidades de persistencia de las bacterias resistentes en los ambientes del procesado de alimentos, tanto como células planctónicas así como biopelículas (Romanova *et al.*, 2007).

En el presente estudio, hemos evaluado la tolerancia/resistencia de distintos grupos microbianos (bacterias psicrótrofas, *Pseudomonas*, *E. coli*, estafilococos y BAL) -aislados de las superficies de procesamiento de carne en un matadero a lo largo de la cadena de producción desde el sacrificio hasta el producto final- a diversos antibióticos y biocidas. A partir de los datos obtenidos en este estudio, surgieron las siguientes preguntas por ejemplo, en qué etapa estas bacterias resistentes alcanzaron el proceso de producción, qué grupo microbiano puede ser predominante y qué antimicrobiano presenta mayor presión selectiva sobre las bacterias resistentes. Cualquier información sobre estas cuestiones puede ser muy valiosa y de gran ayuda para reducir las fuentes de contaminación por las bacterias resistentes durante el procesamiento de la carne y así evitar su diseminación al ser humano vía la cadena alimentaria.

La determinación de la prevalencia de bacterias tolerantes/resistentes a biocidas/antibióticos, aisladas a partir de las superficies del matadero se realizó aplicando diferentes métodos y teniendo en cuenta varios parámetros. Así, en primer lugar, la identificación de los aislados en medios selectivos se basó en la tinción de Gram, obteniéndose un 48-62% de precisión con respecto a los medios selectivos en el caso de *E. coli*, BAL, *Staphylococcus* sp. y *Pseudomonas* sp. Sin embargo, esta precisión fue alta con respecto a los métodos moleculares de identificación (PCR específica de género, PCR específica de especie o secuenciación del 16S DNAr) alcanzándose el 100% de precisión en el caso de las BAL, 92.22%

en el caso de *Pseudomonas* sp., 40% para *Staphylococcus* sp., 17.65% para *E. coli* y 0% en el caso de *Listeria monocytogenes*. La precisión de la tinción de Gram es altamente dependiente del grupo microbiano y también del medio selectivo usado lo que determina el crecimiento específico de microorganismos. Por lo tanto, no podemos sacar conclusiones generales sobre la identidad de dichos microorganismos a partir de este test ya que esto depende también de las condiciones físico-químicas de crecimiento y que la prueba solo sirve para distinguir al grupo de los *Firmicutes* de otras bacterias.

El análisis de la resistencia bacteriana en el ambiente del matadero a lo largo de la cadena de procesamiento de carne reveló una frecuente presencia de bacterias psicrótrofas y pseudomonas (47 y 30%, respectivamente), en casi todas las zonas de la planta de procesamiento de la carne independientemente de los agentes antimicrobianos utilizados (biocidas o antibióticos). Este dato es de gran relevancia, ya que tanto los psicrótrofos (principalmente las bacterias Gram-negativas) como los pseudomonas pueden inducir alteraciones organolépticas en los alimentos (aspecto, color, consistencia, olor y gusto), incluso si éstos son conservados a temperaturas óptimas de conservación (baja temperatura). En general, los principales psicrótrofos presentes en la carne corresponden también a *Pseudomonas* (especialmente *P. fragi*), así como *Acinetobacter* y *Moraxella* (Kraft, 1992). Por otro lado, el análisis de las diferentes zonas de la planta de procesamiento de la carne mostró que la entrada fue una de las zonas con menor porcentaje de aislados resistentes, mientras que la sala de sacrificio fue la zona con mayor número de aislados resistentes incluyendo bacterias patógenas lo que sugiere que los animales pueden ser la mayor fuente de bacterias resistentes a antibióticos y/o biocidas. Dichas bacterias resistentes pueden ser diseminadas después del sacrificio de los animales al ambiente del matadero y de allí a los productos cárnicos que actúan como reservorios de dicha resistencia. Además, el origen de las bacterias resistentes podría ser también evidente en la sala de despiece. De hecho, se obtuvo un mayor porcentaje de bacterias resistentes debido a la diseminación de dichas bacterias a partir de los tejidos y vísceras de los animales. Aunque estos datos indican que la carne cruda puede representar la mayor fuente de bacterias resistentes a antibióticos y/o biocidas, no hay que descartar otras fuentes tales como la manipulación por el operador y el ambiente de producción. Además de las razones expuestas arriba, cabe mencionar que la alta resistencia a los antimicrobianos de las bacterias aisladas de las salas de sacrificio y despiece podría tener su explicación a través de la premisa de que en estas zonas se están utilizando algunos antimicrobianos como agentes desinfectantes. Estos últimos pueden ejercer una presión selectiva para el desarrollo de resistencia a un amplio rango de antimicrobianos con

mecanismos de resistencia similares (por ej. bombas de exporte) o vía transferencia horizontal de genes como ha sido recientemente demostrado por Ciusa *et al.* (2012) en el caso de la resistencia de aislados clínicos al triclosán. En este sentido, el túnel de congelación fue el área con menos bacterias resistentes (2 aislados) debido a las condiciones hostiles de supervivencia representadas por las bajas temperaturas. Sin embargo, se conoce que algunas condiciones ambientales y mecanismos de respuesta al estrés pueden incluso incrementar el desarrollo y expresión de resistencias mediante cambios en la composición de las membranas celulares o mediante la inducción de sistemas de exporte (McCallum *et al.*, 2010), como fue el caso de las bajas temperaturas alcanzadas en las cámaras frigoríficas (por ej. la cámara frigorífica 4 con 49 aislados resistentes, 9%). Con respecto a las zonas de manipulación, la sala blanca mostró un 8.29% de aislados resistentes incluyendo a psicrótrofos, *Pseudomonas* sp., BAL y *Staphylococcus* sp. siendo esta última el resultado de la contaminación de la carne por la manipulación humana durante su empaquetamiento.

Con respecto a los pseudomonas, se obtuvieron un total de 166 aislados mesófilos y psicrótrofos resistentes a biocidas y/o antibióticos a lo largo de la cadena de producción de la carne, siendo altamente resistentes a clorhexidina y QACS (benzalconio y cetrimida). De igual modo, los psicrótrofos no pseudomonas, especialmente representados por bacterias Gram-negativas, mostraron resistencia a clorhexidina y también a triclosán. En general, las bacterias Gram-negativas mostraron más resistencia que las bacterias Gram-positivas a biocidas tales como los QACs, de hecho el cloruro de benzalconio se mostró más efectivo frente a bacterias Gram-positivas que Gram-negativas, excepto *Bacillus cereus* debido a su capacidad formadora de esporas (Fazlara y Ekhtelat, 2012). En cuanto a las bacterias Gram-negativas, varios estudios demostraron que las bacterias en general poseen un perfil diferente de resistencia (*Pseudomonas aeruginosa* > *Escherichia coli* > *Staphylococcus aureus*) frente al cloruro de benzalconio (Heinzl, 1998), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio con los QACs y dicha resistencia viene representada por psicrótrofos > pseudomonas > BAL > *E. coli* > estafilococos. Las BAL principalmente representadas por *Lactobacillus* sp. mostraron una fuerte resistencia a clorhexidina y triclosán, y una resistencia media a benzalconio y PHMG. Las BAL resistentes a los desinfectantes pueden sobrevivir después de la desinfección y causar problemas de alteración, además estas BAL resistentes pueden actuar como fuente de genes de resistencia contribuyendo así a su diseminación como ha sido descrito por Sidhu *et al.* (2001).

Los desinfectantes basados en los QACs tales como el cloruro de benzalconio han sido ampliamente usados en la industria alimentaria y han sido demostrados muy efectivos frente a

varios patógenos tales como *L. monocytogenes* (Van de Weyer *et al.*, 1993). En el presente estudio, no se obtuvieron aislados resistentes de *L. monocytogenes*, lo que indica la ausencia de esta bacteria a lo largo de la cadena de procesamiento de la carne o su alta sensibilidad a los distintos antimicrobianos utilizados en este estudio. Sin embargo, hemos detectado un bajo porcentaje de estafilococos especialmente en la sala de sacrificio y la sala blanca donde el proceso de manipulación podría favorecer la selección de estos microorganismos siendo resistentes a oxonia 6P, triclosán y hexaclorofeno pero no a los QACs. En estas condiciones, no fue posible el aislamiento de estafilococos resistentes a los QACs y biguanidas (PHMG y clorhexidina), a pesar de la resistencia descrita en esta bacteria a los QACs en los productos cárnicos (Sundheim *et al.*, 1992; Heir *et al.*, 1999). Por otro lado, el alto número de aislados de *E. coli* obtenidos en la sala de sacrificio seguida por la sala de despiece en presencia de benzalconio, indica que la contaminación fecal durante el proceso de sacrificio no puede ser completamente evitada a pesar de las estrictas condiciones estandarizadas de higiene en la mayoría de los países desarrollados. Sin embargo, no se detectó *E. coli* en los productos cárnicos, los cuales presentaron especialmente psicrotrofos y pseudomonas capaces de crecer a temperaturas de refrigeración. Podemos concluir que el uso extensivo en la industria alimentaria de los desinfectantes basados en los QACs ha creado un potencial para la selección y diseminación de microorganismos resistentes.

En cuanto al bisbiguanida clorhexidina, éste ha sido usado como desinfectante y conservante efectivo frente a un amplio rango de bacterias, algunos hongos y virus (Reynolds, 1996). Su combinación con cetrimida ha sido una de las fórmulas generales de desinfección (levy, 1998). Los datos de este estudio indican que los grupos microbianos más resistentes a este biocida fueron los psicrotrofos –principalmente representados por bacterias Gram-negativas- y los pseudomonas. Estos resultados concuerdan con los previamente descritos por Russell y Chopra (1996) demostrando que la clorhexidina fue más efectiva frente a bacterias Gram-positivas que Gram-negativas especialmente *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus* spp. Estudios previos llevados a cabo por Thomas *et al.* (2000) indicaron que *P. aeruginosa* mostraba una resistencia intrínseca a clorhexidina debido al papel de su membrana externa como barrera (Guérin- Méchin *et al.*, 2004), mientras que *E. coli* fue menos resistente (Thomas *et al.*, 2000). Sin embargo, en el presente estudio solamente pudimos detectar un bajo porcentaje de aislados resistentes (un aislado). Sin embargo, queremos destacar que las BAL presentaron curiosamente el más alto porcentaje de aislados resistentes a clorhexidina en comparación con otros biocidas (11 aislados).

En lo referente a la resistencia a los antibióticos, destacar que ésta fue dependiente del grupo bacteriano, sin embargo los psicrótrofos no pseudomonas, *Pseudomonas* sp. y las BAL mostraron una elevado porcentaje de resistencia a eritromicina, cefuroxima y amoxicilina. Por otro lado, los estafilococos exhibieron una resistencia media a amoxicilina y cefuroxima, y *E. coli* a amoxicilina y eritromicina. De forma general, la resistencia a los betalactámicos (amoxicilina y cefuroxima) exhibida por todos los grupos microbianos está relacionada con el uso de estos antimicrobianos como agentes terapéuticos en la clínica veterinaria, y la selección de microorganismos resistentes puede ser el resultado de la transferencia genética de determinantes de resistencia potenciada por el uso de desinfectantes especialmente los QACS, clorhexidina y triclosán. En este sentido, es interesante abordar el estudio de una posible resistencia cruzada o una co-resistencia entre los QACs y los betalactámicos especialmente en los psicrótrofos, pseudomonas y las BAL mediante la amplificación de los genes de resistencia tales como *qacA*, *qacB*, *qacG*, etc. en los aislados resistentes a los betalactámicos. Estudios previos han demostrado que algunas cepas de estafilococos albergan en el mismo plásmido los genes *qacA/B* y *blaZ*, y así la vinculación entre la resistencia a desinfectantes y a la penicilina ocurre frecuentemente en los aislados clínicos (Sidhu *et al.*, 2002; Anthonisen *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha descrito previamente que las bacterias multirresistentes poseen integrones con varios casetes de resistencia a antibióticos, incluyendo genes codificadores para betalactamasas de amplio espectro (Jeong *et al.*, 2009) asociadas con los genes *qac*. Sin embargo, estudios llevados a cabo por Sidhu *et al.* (2001) mostraron que no había relación entre los determinantes de resistencia a los QACs y a los antibióticos indicando así que los genes de resistencia pueden ser potencialmente transferidos a patógenos bajo condiciones de estrés y que la presencia de ambos determinantes de resistencia puede contribuir a co-seleccionar cepas resistentes durante la terapia con antimicrobianos o la desinfección en los hospitales o en la industria alimentaria. En nuestro estudio, la frecuencia de resistencias a los betalactámicos (amoxicilina y cefuroxima) y los QACs (clorhexidina y triclosán) fue significativamente alta y merece un análisis en profundidad. Además, la resistencia cruzada entre biocidas y antibióticos ha sido descrita en las BAL aisladas de equipos de procesamiento de alimentos (Russell *et al.*, 1998; Sidhu *et al.*, 2001; Koljalgk *et al.*, 2002).

La correlación entre los diferentes parámetros se realizó mediante un estudio estadístico de “Análisis de Componentes Principales” (ACP), que determinó que los QACs y hexadecilpiridinio fueron los biocidas más relevantes en los aislados resistentes de *Pseudomonas* sp., mientras que el ciprofloxacino y hexaclorofeno lo fueron en los aislados resistentes de psicrótrofos, las BAL, y en menor proporción para estafilococos y *E. coli*. Con respecto al ACP de las zonas de

aislamiento, destacar que las salas de sacrificio y de despiece consideradas como las principales fuentes de bacterias resistentes a antibióticos y/o biocidas mostraron un comportamiento opuesto en lo que se refiere a la relevancia de los antimicrobianos que determinan la resistencia. En este sentido, el hexadecilpiridinio, cetrimida y clorhexidina fueron más relevantes en la sala de despiece, mientras que el hexaclorofeno, oxonia 6P y PHMG lo fueron en la sala de sacrificio. Por lo tanto, es recomendable el uso rotatorio de los desinfectantes en ambas salas para evitar la emergencia de bacterias resistentes en áreas frecuentemente desinfectadas.

Considerando los resultados de la frecuencia de bacterias resistentes a antibióticos y/o biocidas en el matadero de corderos y cabras a lo largo de la cadena de producción de la carne, nos pareció de gran interés abordar el estudio de la diversidad, distribución y cuantificación de los genes más relevantes de resistencia a antibióticos (tetraciclina, sulfonamidas y betalactámicos) a lo largo de la cadena de producción de carne hasta el producto final. La distribución y amplia presencia de genes de resistencia a antibióticos es un tema preocupante, considerando el riesgo potencial asociado a la diseminación de genes de resistencia a antibióticos a lo largo de la cadena de producción de carne hasta los productos finales. A pesar de que las operaciones llevadas a cabo en un matadero siguen rigurosamente buenas prácticas de higiene, los riesgos relacionados con la contaminación de superficies y productos finales con bacterias resistentes a antibióticos pueden producirse. Así, para entender estos riesgos y los patrones de diseminación de los genes de resistencia, se cuantificaron diversos genes de resistencia a antibióticos en todas las zonas del matadero a lo largo de la cadena de producción de carne. Como ha sido previamente mencionado, un matadero se compone de diversas zonas donde la carne y sus productos son procesados, y cada zona posee unas condiciones ambientales y de superficie características que influyen en la presencia y la persistencia de bacterias. El flujo de bacterias resistentes a antibióticos y de sus genes de resistencia a lo largo de la cadena de producción de carne ha sido ampliamente documentado en la literatura, especialmente en mataderos de cerdos y aves de corral, siendo muchos de ellos enfocados sobre determinadas especies bacterianas y determinantes de resistencia específicos (Van den Bogaard *et al.*, 2001; Guardabassi *et al.*, 2007; Aarestrup *et al.*, 2008; Brtkova y Bujdakova, 2009; Gregova *et al.*, 2012; Lavilla- Lerma *et al.*, 2014). Por lo tanto, hemos abordado por primera vez el estudio de la resistencia a antibióticos en la microbiota total presente en un matadero de corderos y cabras a lo largo de la cadena de producción de la carne.

En el presente estudio, todas las superficies analizadas del matadero presentaron genes de resistencia a antibióticos, destacando la sala de sacrificio y la sala de despiece con una elevada diversidad, sin embargo la entrada y el túnel de congelación fueron las zonas con una diversidad muy baja en cuanto a los genes de resistencia a antibióticos. Con respecto a los genes detectados, los más distribuidos fueron *sulIII*, *sulI*, *sulII* y *tetB*, mientras que *tetO* fue el gen menos detectado. Queremos destacar también que casi todos los productos finales dieron positivo en la amplificación de los genes *sulIII* y *tetA*, pero ninguna para el gen *bla<sub>CTX</sub>*. Los valores medios de cuantificación que se obtuvieron en las diferentes zonas del matadero siguieron el siguiente patrón: *tetB* ( $10^{5.5}$  genes/ cm<sup>2</sup>) > *tetQ* > *sulII* > *sulI* > *tetA* > *sulIII* > *bla<sub>TEM</sub>* > *tetO* > *bla<sub>CTX</sub>* ( $10^1$  genes/ cm<sup>2</sup>). La gran cantidad de genes de resistencia a tetraciclinas (especialmente *tetB* y *tetA*, codificadores de una bomba de exporte) presentes en este matadero, en el cual predominan bacterias Gram-negativas (73% incluyendo *Pseudomonas* spp., *E. coli* y psicrótrofos Gram-negativos no identificados) como ha sido descrito por Lavilla Lerma *et al.* (2012), está en concordancia con lo que postularon otros autores sobre la elevada resistencia a tetraciclinas de las bacterias Gram-negativas aisladas de productos animales y ambientes de otros mataderos (Gow *et al.*, 2008; Skockova *et al.*, 2012; Aradhya *et al.*, 2014). A su vez, la gran diversidad y la movilidad genética de los genes *tet* contribuyen a su diseminación entre diferentes bacterias (Roberts, 2005). Con respecto a los genes de resistencia a tetraciclina (*tetO* y *tetQ*) codificadores de proteínas de protección ribosomal y que han sido comúnmente encontrados en el tracto intestinal de ganado y también en el medio ambiente, la cuantificación en nuestro caso fue variable en las diferentes zonas del matadero.

En lo referente a los genes *sul*, la cuantificación de éstos fue variable siendo el gen *sulII* el más abundante en la mayoría de los casos, mientras que el gen *sulIII* fue el más diseminado a lo largo de las diferentes zonas del matadero. La elevada prevalencia de la resistencia a sulfonamidas en humanos y animales ha sido ampliamente descrita a nivel mundial debido a su frecuente uso en la clínica veterinaria, y su fácil diseminación al hombre vía la cadena alimentaria (Hummerum *et al.*, 2006; Trobos *et al.*, 2006). Además, la localización de los genes de resistencia a las sulfonamidas en elementos móviles puede explicar su amplia distribución (Antunes *et al.*, 2005; Bean *et al.*, 2009).

En cuanto a las betalactamasas, tanto los genes *bla<sub>CTX</sub>* como *bla<sub>TEM</sub>* están ampliamente distribuidos en los patógenos Gram-negativos (Coque *et al.*, 2008), sin embargo en este estudio su presencia no ha sido tan elevada como se esperaba. Además, las concentraciones relativas del gen *bla<sub>TEM</sub>* fue cuantitativamente más altas que el gen *bla<sub>CTX</sub>*.

Los análisis de los genes de resistencia proporcionan informaciones cuantitativas para evaluar los riesgos en cada zona del matadero y también en los productos finales. En este sentido, el análisis de la suma de las cuantificaciones de los genes *tet* (*tetA+tetB+tetO+tetQ*), *sul* (*sulI+ sulII+ sulIII*) y betalactamasas (*bla<sub>CTX</sub>+ bla<sub>TEM</sub>*) en las diferentes zonas del matadero y también en otros productos cárnicos obtenidos de diferentes supermercados (carne picada, jamón o jamón cocido), mostró que los genes de resistencia a tetraciclina fueron los más prevalentes (del orden de 2 o 10 veces superior a las sulfonamidas y betalactamasas, respectivamente). Este dato no es sorprendente, puesto que los genes de tetraciclinas se encuentran distribuidos en elementos genéticos conjugativos promiscuos (Roberts, 2005; Thaker *et al.*, 2009), habiéndose detectado la presencia de genes *tet* en bacterias procedentes de diferentes ambientes (tales como suelos, lodos, aguas residuales, ríos, aguas, y agricultura) (Pei *et al.*, 2006; Auerbach *et al.*, 2007; Knapp *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2013) y también de alimentos (Florez *et al.*, 2008). Los reservorios más importantes de los genes de tetraciclina fueron las salas de despiece, la sala de sacrificio y los productos cárnicos comerciales, mientras que los grupos de sulfonamidas y betalactamasas se presentaron en la sala de sacrificio.

El análisis estadístico de las concentraciones relativas de cada gen de resistencia a antibióticos indicó una ausencia de diferencias significativas entre las diferentes zonas del matadero y los productos cárnicos comerciales en cuanto a los genes *tetA*, *tetO*, *tetQ*, *sulI*, *sulII* y *sulIII*, lo que sugiere que la resistencia puede haber sido adquirida mediante diseminación de genes a lo largo de las diferentes zonas del matadero hasta los productos finales; la excepción las encontraríamos en los genes *tetB*, *bla<sub>CTX</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>*, los cuales mostraron diferencias significativas y por lo tanto aparecen como “puntos calientes” dentro del circuito de procesamiento de la carne. Además de la transmisión indirecta de las bacterias resistentes a lo largo de la cadena alimentaria debido al consumo de productos animales, la resistencia se puede adquirir por el contacto directo en las granjas por los trabajadores del matadero y los veterinarios, los cuales pueden ser vectores potenciales de genes de resistencia a antibióticos para su diseminación a la comunidad y el medio ambiente (Molbak *et al.*, 1999). Además, en este estudio se detectaron correlaciones positivas entre diferentes zonas del matadero (especialmente entre la sala de sacrificio SR, la sala de despiece SR y la sala blanca WR) lo que indica la existencia de un flujo de genes de resistencia a través de la manipulación, canales, transporte y utensilios.

En conclusión, las superficies del matadero así como determinados productos cárnicos comerciales pueden servir como grandes reservorios de genes de resistencia a antibióticos



especialmente los genes *tet*. Los mayores riesgos aparecen en la sala de despiece y la sala de sacrificio poniendo en evidencia la diseminación de las bacterias resistentes a antibióticos (y sus genes) hasta los productos finales. Dichos datos llaman la atención para reflexionar sobre las medidas a adoptar en dichas zonas para evitar el riesgo de transferencia de los genes a lo largo de las diferentes zonas del matadero mediante contaminación cruzada.

Ya habíamos determinado la prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos y/o biocidas así como la distribución de genes de resistencia más relevantes a lo largo de la cadena de producción de la carne en diferentes zonas del matadero hasta los productos finales. En este estudio nos pareció interesante abordar el análisis de un grupo microbiano específico de gran importancia en el matadero de corderos y cabras, los pseudomonas. Estas bacterias se consideran las principales alterantes de la carne cruda almacenada aeróbicamente (Gennari y Dragotto, 1992; Stanbridge y Davies, 1998; Labadie., 1999; Gill, 2003; Ercolini *et al.*, 2007) y la prevalencia de los pseudomonas multirresistentes a diferentes agentes antimicrobianos ha sido el objeto de varios estudios incluyendo aquellos aislados de los ambientes de mataderos de cerdos y aves de corral (Miko *et al.*, 2005; Gregova *et al.*, 2012; Schwaiger *et al.*, 2012; De Oliveira *et al.*, 2013). Nuestros datos indicaron que los pseudomonas multirresistentes (122 pseudomonas mesófilos y psicrótrofos, 100%) están presentes en todas las zonas de la planta de procesamiento de la carne (77%), a excepción del túnel de congelación, y de los productos cárnicos (23%), siendo representados por *P. lundensis* (65%), *P. putida* (17%), *P. fragi* (8%), *P. fluorescens* (6%) y *P. alkylphenolia* (4%). El bajo grado de heterogeneidad genética mostrado por los pseudomonas mesófilos y psicrótrofos mediante el tipado molecular por ERIC-PCR indica su elevada relación genética. Además, algunos aislados de pseudomonas mesófilos y psicrótrofos mostraron un perfil idéntico de ERIC-PCR, a pesar de ser aislados de diferentes zonas o incluso de productos cárnicos comerciales (carne picada jamón y jamón cocido), lo que sugiere que la principal fuente de estas cepas de pseudomonas idénticas, son los animales y el ambiente del matadero. Entonces, las carcasas de animales contaminadas con bacterias ambientales pueden diseminar los pseudomonas a lo largo de todas las zonas del matadero e incluso hasta los productos finales. En este sentido, sería interesante en el futuro abordar estudios sobre los pseudomonas aislados de animales vivos para su comparación con los datos obtenidos en el matadero.

Los fenotipos multirresistentes (4-13 antibióticos) fueron detectados en ambas poblaciones de pseudomonas (mesófilas y psicrótrofas), siendo resistentes a sulfametoxazol, eritromicina, amoxicilina, ampicilina, cloranfenicol, trimetoprima, rifampicina y ceftazidima (especialmente los mesófilos) y colistina y tetraciclina (los psicrótrofos), independientemente de la identidad

de la especie. Sin embargo, se obtuvo un porcentaje de resistencia muy bajo para ciprofloxacino, gentamicina, imipenem y kanamicina. Los pseudomonas mesófilos más resistentes, especialmente *P. lundensis*, fueron frecuentemente aislados de la sala de despiece (CR) así como de productos cárnicos adquiridos en supermercado, sin embargo los pseudomonas psicrótrofos resistentes fueron aislados de las cámaras frigoríficas (F3 y F4). La multirresistencia de pseudomonas a diversos grupos de antibióticos es un tema ampliamente documentado (Nikaido, 1994, 1996; Juan *et al.*, 2010; De Oliveira *et al.*, 2013). Esta multirresistencia se debe a múltiples mecanismos intrínsecos o adquiridos, tales como la baja permeabilidad de la membrana externa (Juan *et al.*, 2010), la producción de betalactamasas o la presencia de bombas de exporte con amplia gama de sustratos (Nikaido, 1994; Henwood *et al.*, 2001). En el presente estudio, encontramos resistencia hasta a 13 antibióticos lo cual se trata de un dato preocupante (el 65% de los pseudomonas fueron resistentes a 8-13 antibióticos) debido a la presencia de todos los mecanismos conocidos de resistencia. El aumento de la resistencia de los pseudomonas aislados del ambiente del matadero puede ser debido a varias razones, como el uso de los antimicrobianos (biocidas y antibióticos) que pueden potenciar la transferencia y la recombinación genética mediante activación del sistema SOS (Couce y Blazquez, 2009; Guerin *et al.*, 2010), el crecimiento en biopelículas y la presencia de patógenos como reservorios de genes de resistencia.

La elevada resistencia de los pseudomonas a los betalactámicos (ampicilina, amoxicilina y ceftazidima) se relacionó con la presencia de betalactamasas de amplio espectro (ESBLs) localizadas en plásmidos y codificadas por los genes *bla<sub>CTX</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV-1</sub>* y *bla<sub>OXA</sub>*. Por lo tanto la resistencia adquirida de los pseudomonas mesófilos y psicrótrofos reflejada por la distribución bi o multimodal de la MIC, fue debida en la mayoría de los casos a la adquisición de los genes *bla<sub>CTX</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>* por mecanismos de transferencia horizontal (como secuencias de inserción, integrones de la clase 1, transposones o plásmidos). Sin embargo, sólo algunas cepas presentaron integrones clase 1 y clase 2. Cabe señalar que la adquisición independiente de los elementos móviles transportadores de genes *bla*, *bla<sub>CTX</sub>* o *bla<sub>TEM</sub>*, pueden llevar a la ocurrencia simultánea de más de un gen en la misma cepa.

En lo referente al cloranfenicol, los genes de resistencia *catA2* o *catB3* prevalentes en los pseudomonas mesófilos y psicrótrofos, están ampliamente diseminados entre muchas bacterias (Kim *et al.*, 2013), sugiriendo así que la resistencia adquirida observada era debida a mecanismos de transferencia genética horizontal. Por otro lado, la adquisición de los genes de resistencia a sulfametoxazol (*sulII*), que se encuentran fundamentalmente en plásmidos y asociados con integrones de la clase 1 (Randstrom *et al.*, 1991; Partridge *et al.*, 2009), vía

transferencia horizontal de genes por los pseudomonas ha sido documentada en bacterias entéricas aisladas de animales sanos y humanos (Enne *et al.*, 2001; Kozak *et al.*, 2009), siendo el gen *sulll* el más prevalente en ausencia de la presión selectiva en clínica (Enne *et al.*, 2004). En este estudio, la adquisición de los genes *catA2* y *sulll* por parte de los psicrótrofos *P. fragi* detectados en la zona de entrada del matadero, se debió probablemente a la presencia de integrones de la clase 1 en estas cepas que fueron adquiridos de otros microorganismos del medio ambiente o de animales, y podrían ser responsables de la diseminación de estos genes a lo largo de la cadena de producción de la carne.

La resistencia a tetraciclinas (genes *tetA*, *tetB*, *tetO* y *tetQ*), trimetoprima (gen *dfrD*) y eritromicina (genes *ereA*, *ereB*, *msrA* y *mefA*) fue parcialmente debida a la presencia de los correspondientes genes de resistencia, siendo los genes *ereA* y *tetQ* los más prevalentes. Como ha sido descrito con anterioridad por otros autores, los genes *tetO* y *tetQ* fueron predominantes en el tracto gastrointestinal de cerdos y novillos, así como en el estiércol (Zhu *et al.*, 2013), siendo frecuentemente asociados con transposones conjugativos (Leng *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2013). En este estudio, la adquisición de genes *tetQ* y *ereA* por *P. putida* en la entrada, sugiere que la fuente de estos genes está relacionada con los propios animales o el ambiente de la entrada.

La vinculación genética de los genes *sulll*, *dfrD* y *tet* a determinantes como *bla<sub>CTX</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>*, que confieren resistencia a betalactámicos, se debió en parte a la presencia de integrones de la clase 1 (17%) que han sido implicados en la movilidad de los genes de resistencia (Gaze *et al.*, 2005; Lynne *et al.*, 2009); por lo tanto el uso común de los betalactámicos podría explicar la persistencia de estos genes y el incremento en la multirresistencia de los pseudomonas en el matadero. En consecuencia, Tadesse *et al.* (2012) establecieron una vinculación entre los genes de resistencia a sulfonamidas y los determinantes de resistencia a tetraciclinas y estreptomicina. La multirresistencia de los pseudomonas que carecen de determinantes genéticos de resistencia específicos se debe a otros mecanismos de resistencia tales como las bombas de exporte de antimicrobianos con amplia especificidad de sustrato (MexAB-oprM, MexCD-OprJ, MexXY-OprM y AcrAB-TolC, 52%), siendo los genes *mexB*, *mexD* y *acrB* los más detectados. Estas bombas de exporte actúan sinérgicamente con la barrera de la permeabilidad dando como resultado una resistencia intrínseca significativa a diferentes antimicrobianos (Poole *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1994; Zgurskaya y Nikaido, 2000; Jeffrey *et al.*, 2003).

La correlación de la resistencia de los pseudomonas llevada a cabo mediante la herramienta estadística ACP de las zonas de muestreo y los productos finales comerciales determinó que la sala de despiece y los productos cárnicos comerciales son considerados las principales fuentes de pseudomonas mesófilos resistentes a antibióticos, aunque mostraron un comportamiento opuesto respecto a la relevancia de antibióticos para determinar la resistencia. Los pseudomonas psicrótrofos más resistentes fueron aislados de las cámaras frigoríficas F3 y F4, y también de la entrada. Sin embargo, el agrupamiento basado en el resistoma no concuerda con esta conclusión, ya que los pseudomonas mesófilos de la sala de despiece muy relacionados con aquellos de los productos cárnicos comparten el mismo origen de determinantes de resistencia con la entrada y la zona de sacrificio (grupo 2), algo similar ocurre con los psicrótrofos de las cámaras frigoríficas F3 (grupo 1), F4 (grupo 3), y F1 y F2 (grupo 5). Estos datos muestran una clara divergencia entre la resistencia fenotípica y genotípica de los pseudomonas en el ambiente del matadero, dado que mecanismos específicos e inespecíficos inducidos por un amplio rango de antibióticos pueden ocurrir en diferentes zonas. Es frecuente que más de un gen esté asociado con un fenotipo determinado de resistencia.

En resumen, hemos revelado por primera vez en las superficies de un matadero de corderos y cabras la alta prevalencia de pseudomonas multirresistentes a antibióticos comúnmente usados en la clínica. Esto puede reflejar el mal uso o el abuso de los agentes antimicrobianos en animales y el medio ambiente. Además, la elevada similitud entre las diferentes superficies del matadero y los productos finales, en relación con los perfiles de resistencia fenotípica y genotípica de los pseudomonas multirresistentes aislados en el presente estudio sugieren que los productos cárnicos juegan un papel importante como reservorios de determinantes de resistencia para su diseminación a los patógenos humanos. También sugieren la existencia de cepas multirresistentes comunes adaptadas a los ambientes de la industria cárnica. Considerando la elevada contaminación de las superficies con pseudomonas multirresistentes, se puede asumir que estos microorganismos altamente resistentes pueden ser transmitidos directamente a los humanos vía transporte, transacción y preparación de los alimentos. No está clara la relación entre los microorganismos ambientales y los patógenos humanos, sin embargo, estudios recientes mostraron que las bacterias del suelo y los patógenos humanos compartían un resistoma de antibióticos (Warren *et al.*, 2008), de igual modo entre animales y trabajadores de la granja (Van den Bogaard *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2013). Considerando que el ambiente de la entrada (primera zona en el matadero donde los animales se mantienen durante un periodo de tiempo determinado

antes de su sacrificio) compartía con los productos cárnicos varios determinantes de resistencia a antibióticos (unos 6) y que están implicados en la resistencia a diferentes antibióticos, podemos sugerir que la entrada, donde algunos genes de resistencia fueron determinados por primera vez (*catA2*, *sullI*), es la zona clave en la diseminación de la resistencia a antibióticos a lo largo de las diferentes zonas del matadero incluyendo los productos finales de carne de otros animales comprados en supermercados. Además, otras zonas tales como la sala de despiece y las cámaras frigoríficas, donde se aislaron más cepas de *Pseudomonas* multirresistentes, deben ser exhaustivamente controlados especialmente la cámara frigorífica F1 localizada entre la sala de sacrificio y la sala de despiece. Este hecho debe ser tomado en consideración para evitar la contaminación cruzada y el subsiguiente flujo de determinantes móviles de resistencia a lo largo de todas las zonas del matadero, y así evitar la diseminación de resistencias a los humanos y el medio ambiente, mediante la aplicación de prácticas adecuadas de higiene y medidas de desinfección, incluyendo la lana, el pelo y las patas de los animales y también el ambiente de la entrada. Las estrategias prácticas deben ser aplicadas en los mataderos, incluyendo unas buenas prácticas de ganadería para prevenir enfermedades y una buena higiene de animales antes de acceder a la entrada en una sala “pre-entrada”, la cual puede ser creada con este propósito para así aplicar un suave y corto lavado a los animales y eliminar la mayoría de los microorganismos presentes en la superficie de los animales.

Considerando la multirresistencia de los *Pseudomonas* a los antibióticos, nos pareció interesante investigar su resistencia a biocidas comúnmente usados en la industria alimentaria, y también dilucidar si existe alguna correlación entre ambos antimicrobianos.

Existe una creciente preocupación sobre el posible papel de los biocidas en la selección y diseminación de la resistencia a antibióticos, así varios estudios se enfocaron sobre la susceptibilidad a biocidas (determinación de la MIC y su distribución) en bacterias de origen clínico. Sin embargo, la distinción entre cepas salvajes y resistentes no ha sido establecida hasta este último año (2014) para algunos biocidas en *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Enterococcus faecium* y *E. faecalis* (Morrissey et al., 2014). Por lo tanto, no existen estudios sobre *Pseudomonas* y así en el presente estudio nuestra motivación fue rellenar los huecos que existen en la literatura en cuanto a los valores ECOFFs de biocidas en las especies de *Pseudomonas* y también evaluar esta resistencia en las cepas resistentes a antibióticos (Lavilla Lerma et al., 2014) que han sido aisladas del matadero de corderos y cabras a lo largo de la cadena de producción de la carne. En general, los ECOFFs de todos los biocidas determinados

en este estudio en las especies de *Pseudomonas* fueron más bajos que aquellos determinados en otras bacterias tales como *Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus* y *E. faecalis* entre otros (Morrissey *et al.*, 2014) excepto para triclosán en *P. lundensis*. El bajo valor ECOFF de biocidas determinado en pseudomonas podría ser debido a diferencias en la estructura celular entre diferentes bacterias e incluso entre especies del mismo género ya que los biocidas tienen como diana varias estructuras celulares (Russell, 2003). Es interesante destacar que ninguno de los pseudomonas aislados del matadero de corderos y cabras fue resistente a los biocidas industriales ensayados en este estudio y cuya fórmula está basada en principios activos específicos tales como topax 66 y oxonia P3. Estas formulaciones industriales contienen hidróxido de sodio, hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno, ácido acético entre otros como agentes biocidas activos actuando a diferentes niveles de la célula bacteriana y esto podría explicar la ausencia de cepas resistentes.

La resistencia a biocidas es ampliamente documentada especialmente al triclosán que es el biocida más utilizado en diferentes áreas (clínica, industria y veterinaria). Tal incrementada resistencia o tolerancia es debida al sobreuso y a la presión selectiva que permite la presencia de elementos genéticos móviles albergando genes específicos implicados en la resistencia a biocidas y antibióticos.

El papel ejercido por los biocidas en el incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos es de gran preocupación, ya que se produjeron muchos cambios en la legislación Europea y reclamaciones sobre el riesgo del uso de biocidas. En este estudio, hemos analizado estadísticamente las posibles interconexiones entre biocidas (comúnmente usados en la industria alimentaria) y antibióticos (frecuentemente usados en la clínica), dicha relación ha sido ampliamente documentada y está frecuentemente basada en la sobre-expresión de bombas de exporte (Buffet-Bataillon *et al.*, 2012; Frimodt-Møller and Kolmos, 2011). En el presente estudio, hemos detectado correlaciones positivas entre diferentes antibióticos, biocidas y la combinación de ambos antimicrobianos los cuales fueron altamente dependientes del tipo de la población de pseudomonas (los mesófilos mostraron múltiples correlaciones). Antibióticos de la misma clase que comparten el mismo mecanismo de resistencia y cuya diana es una determinada estructura celular tales como la síntesis de la pared celular por los betalactámicos (amoxicilina, ampicilina, ceftazidima y imipenem), la membrana citoplasmática por los lipopéptidos (polimixina B y colistina), la síntesis de proteínas vía la inhibición de la subunidad ribosómica 30S por los aminoglucósidos (gentamicina, kanamicina y estreptomycin) y tetraciclina o por la inhibición de la subunidad ribosómica 50S por eritromicina y cloranfenicol, exhiben una fuerte-moderada correlación con

otros antibióticos. Estos datos sugieren que la disminución de la susceptibilidad a un determinado antibiótico puede preceder o incluso predecir la disminución de susceptibilidad para el otro (s) antibiótico(s) de la misma clase en el ambiente del matadero de corderos y cabras. Además, antibióticos pertenecientes a diferentes clases y cuyas dianas son diferentes estructuras celulares mostraron también correlaciones positivas tales como la polimixina B y tetraciclina (*pseudomonas* mesófilos), lipopéptidos y diferentes antibióticos (gentamicina, imipenem, tetraciclina y trimetoprima o ceftazidima para los *pseudomonas* mesófilos y psicrótrofos, respectivamente), imipenem y tetraciclina (psicrótrofos), trimetoprima y eritromicina entre otros. En este caso, correlaciones positivas pueden ser debidas a la co-resistencia siendo los mecanismos de resistencia no-relacionados transportados por el mismo elemento genético móvil (plásmido, transposon o integron), o una resistencia cruzada que se basa en mecanismos específicos de resistencia con un amplio rango de actividad frente a los antibióticos tales como las bombas de exporte. En este sentido, los estudios presentados en esta tesis mostraron la presencia de la clase 1 y 2 de integrones en algunas cepas de *pseudomonas* distribuidos a lo largo de la cadena de producción de la carne en el matadero de corderos y cabras pero también diferentes bombas de exporte tales como MexAB-oprM, MexCD-OprJ, MexXY-OprM y AcrAB-TolC. Cabe destacar que algunos antibióticos no-relacionados pueden seleccionar para la resistencia a otros antibióticos, así conocimientos previos sobre este tema en el matadero es de gran importancia ya que es necesario seleccionar tratamientos adecuados con antibióticos considerando los datos obtenidos en este estudio.

En cuanto a los biocidas que tienen como diana diferentes estructuras celulares mediante mecanismos inespecíficos excepto el triclosán (inhibición de la enoil-reductasa), éstos mostraron también correlaciones positivas especialmente en los *pseudomonas* mesófilos. En los *pseudomonas* mesófilos se detectaron correlaciones positivas entre topax 66, triclosán, cloruro de benzalconio o oxonia P3; cetrimida y PHMG, cloruro de benzalconio o oxonia P3; y también entre hexaclarofeno y cloruro de benzalconio. Sin embargo, los *pseudomonas* psicrótrofos mostraron correlaciones positivas solamente en el caso de triclosán y clorhexidina, y topax 66 y cloruro de benzalconio.

La resistencia cruzada entre antibióticos y biocidas fue especialmente detectada entre PHMG o triclosán y diferentes antibióticos dependiendo del biocida en cuestión y del tipo de población de *pseudomonas*. Así, el uso de estos biocidas como desinfectantes en las zonas del matadero debe ser considerado debido al efecto de la presión selectiva de los antibióticos, la cual puede causar la emergencia y la diseminación de cepas resistentes al consumidor. Cabe

destacar que las fórmulas industriales específicas tales como topax 66 y oxonia P3 mostraron pocas correlaciones con los antibióticos (ninguna o con 1-2 antibióticos), lo cual debe ser tomado en consideración en las prácticas de desinfección aplicadas en las diferentes zonas del matadero. Su composición que incluye varios biocidas les hace actuar sobre diferentes dianas y el desarrollo de resistencia se hace mucho más difícil o prácticamente nula en comparación con el uso individual de cada biocida tales como el triclosán. Este último ha causado la aparición de muchas cepas resistentes de *Pseudomonas* tanto mesófilas como psicrótrofas.

En conclusión, este trabajo pone de manifiesto que algunos biocidas deben ser re-evaluados para evitar la aparición de resistencia y también aporta información sobre algunas de las estrategias a adoptar para la desinfección de las diferentes zonas del matadero de corderos y cabras tales como es el caso del uso de formulaciones específicas basadas en diferentes biocidas. Además, cabe señalar la importancia de vigilancia en cuanto al uso de algunos antibióticos en los tratamientos veterinarios tales como es el caso de los betalactámicos (amoxicilina y ampicilina), gentamicina, eritromicina y colistina (en los *Pseudomonas* mesófilos) para controlar las posibles interconexiones que puedan surgir con otros antimicrobianos.

Otro de los grupos microbianos conocidos por su multirresistencia es el de los enterococos. Estas bacterias caracterizadas por su ubicua distribución en la naturaleza y también en los alimentos causan un gran desafío en cuanto a su presencia en los alimentos debido a su doble faceta tanto como contaminantes así como cultivos iniciadores o probióticos (Stiles y Holzapfel, 1997; Franz *et al.*, 1999; Giraffa, 2002; Foulquie-Moreno *et al.*, 2006). Los enterococos poseen mecanismos intrínsecos y adquiridos de resistencia a antibióticos (Murray *et al.*, 1990; Klare *et al.*, 2002, 2003; Hummel *et al.*, 2007) lo que les convierte en importantes patógenos nosocomiales. El presente estudio fue enfocado sobre la resistencia a diferentes antibióticos en cepas de enterococos aisladas de diferentes alimentos fermentados dado el alto valor de estos alimentos en la dieta a nivel mundial.

Los resultados obtenidos de los estudios llevados a cabo sobre la resistencia a antibióticos en los enterococos (14 cepas de *E. faecalis* y 41 cepas de *E. faecium*) aislados de diversos alimentos fermentados (tanto de origen animal y vegetal) y agua, revelaron que ambas especies mostraron una baja resistencia a gentamicina, ampicilina y penicilina. Sin embargo, se detectó una alta incidencia de resistencia a rifampicina, ciprofloxacino y eritromicina, resultados que concuerdan con estudios anteriores (Ben Omar *et al.*, 2004; Pérez- Pulido *et al.*, 2006; Valenzuela *et al.*, 2008). En cuanto a la resistencia a los glicopéptidos tales como



vancomicina y teicoplanina y a los aminoglucósidos, pocas cepas fueron simultáneamente resistentes a teicoplanina y vancomicina, en contraposición de lo descrito por otros autores (Kacmaz y Aksoy, 2005). Cabe destacar que estas cepas resistentes a vancomicina y/o teicoplanina pueden causar problemas serios en los tratamientos clínicos como ha sido relatado en otros estudios (Brown *et al.*, 2006), sin embargo estos enterococos fueron susceptibles a ampicilina y penicilina lo cual es de gran importancia para la salud (Filipová *et al.*, 2006).

Con respecto a la multirresistencia, de las 55 cepas analizadas, 27 (19 cepas de *E. faecium* y 8 cepas de *E. faecalis*) mostraron una resistencia múltiple al menos a 3 antibióticos, e incluso algunas cepas fueron resistentes a 6-8 antibióticos especialmente *E. faecalis*. Es interesante indicar que las cepas de *E. faecalis* con resistencia a 6-8 antibióticos fueron aisladas de alimentos de origen animal. La resistencia a tetraciclina y eritromicina en cepas de origen animal está relacionada con el uso de estas clases de antibióticos en ganadería (Šustačková *et al.*, 2004; Kročko *et al.*, 2011). En cuanto a *E. faecium*, se detectó multirresistencia a 5-8 antibióticos; todas estas cepas eran de origen animal excepto la cepa *E. faecium* H2OP3 aislada de agua. La presencia de bacterias multirresistentes en los alimentos puede tener efectos negativos en el tratamiento de enfermedades, lo que se traduce a su vez, en incrementos en los costes sanitarios (Roberts *et al.*, 2009; Wassenberg *et al.*, 2010) debido a la transmisión de estas bacterias al hombre a través de la cadena alimentaria, especialmente alimentos de origen animal como carne y queso. La frecuencia de los enterococos multirresistentes en animales domésticos y alimentos ha sido el objeto de varios estudios (Peters *et al.*, 2003; Leclercq, 2009; Vignaroli *et al.*, 2011), poniendo en relevancia el papel de los reservorios no humanos como fuentes de genes de resistencia. En este estudio, el porcentaje de cepas de *E. faecalis* multirresistentes (57% de *E. faecalis*) fue mayor que el de *E. faecium* (46% de *E. faecium*), posiblemente debido a la presencia de los elementos genéticos móviles asociados con *E. faecalis*.

En lo referente a los determinantes de resistencia, los genes *tet* fueron detectados en todas las cepas resistentes a tetraciclina siendo los genes *tet(L)* o *tet(M)*, o la combinación de ambos los más distribuidos entre todas las cepas. Además, el gen *tet(M)* fue más prevalente que el gen *tet(L)* en los enterococos estudiados, lo que concuerda con otros estudios realizados sobre enterococos de origen alimentario (Aarestrup *et al.*, 2000; Huys *et al.*, 2004; Wilcks *et al.*, 2005). Por otro lado, no se pudo detectar los genes *tet(O)*, *tet(S)* y *tet(K)*, al igual que en los estudios previos de Wilcks *et al.* (2005) y Huys *et al.* (2004). En estos casos, la incidencia de los genes *tet(O)* y *tet(S)* fue muy baja (< 10%), lo que sugiere que las oportunidades para aislar

enterococos portadores de estos determinantes de resistencia podría ser mayor si el volumen de la muestra es grande. Ambos genes *tet(M)* y *tet(S)* fueron encontrados en productos crudos, mientras que solamente el gen *tet(M)* fue detectado después de la fermentación como ha sido descrito por Teuber *et al.* (1999) y Gevers *et al.* (2003) en productos cárnicos.

En cuanto a la resistencia a cloranfenicol, todas las cepas resistentes a este antibiótico poseían el gen *cat*, y esto concuerda con estudios previos (Werner *et al.*, 2000; Teuber *et al.*, 2003; Huys *et al.*, 2004). Las cuatro cepas que presentaron resistencia a cloranfenicol también lo fueron a tetraciclina. La presencia de enterococos resistentes a cloranfenicol en alimentos ha sido frecuentemente descrita en la literatura científica (Teuber *et al.*, 1999; Franz *et al.*, 2001). Los genes *cat* se encuentran en plásmidos con multirresistencia, tales como el plásmido conjugativo pRE25 de *E. faecalis* (Schwarz *et al.*, 2001; Teuber *et al.*, 2003), el plásmido conjugativo pUW1965 (Werner *et al.*, 2000) y el plásmido no-conjugativo pRUM de *E. faecium* (Grady y Hayes, 2003). La secuencia de los genes *cat* encontrados en plásmidos contiene usualmente segmentos genéticos de pequeños plásmidos de estafilococos o estreptococos (ej. pIP501), indicando así que estos genes son originarios de *Streptococcus* o *Staphylococcus* spp. (Grady y Hayes, 2003; Klare *et al.*, 2003; Pepper *et al.*, 1986).

En cuanto a la resistencia a eritromicina, 52% de los enterococos fueron resistentes a este antibiótico, siendo solamente las cepas de *E. faecium* (66%) portadores de los genes *msrA/B* codificadores de una bomba de exporte, como se describió anteriormente (Hummel *et al.*, 2007; Portillo *et al.*, 2000; Toomey *et al.*, 2010). Sin embargo, aislados clínicos de *E. faecalis* mostraron la presencia del gen *msrA/B* como ha sido documentado por Chouchani *et al.* (2012). En cuanto a los otros genes implicados en la resistencia a eritromicina, no se detectaron los genes *erm(C)*, *ereA/B*, *mefA/E* y *mphA*, sin embargo el gen *erm(B)* fue detectado en *E. faecalis* y *E. faecium*. Estos datos concuerdan con aquellos descritos por Jensen *et al.* (1999) y Khan *et al.* (2002) quienes determinaron la predominancia de dicho gen sobre los demás genes codificadores de la resistencia a eritromicina. Además, hemos detectado el gen *erm(B)* en tres cepas adicionales de *E. faecalis* susceptibles a eritromicina, el mismo resultado fue obtenido por McBride *et al.* (2007) en *E. faecalis*. Este hecho se puede explicar de la siguiente forma, al tratarse de un gen silencioso o que carece de funcionalidad. Es frecuente que el gen *erm(B)* ocurre tanto en plásmidos conjugativos tales como pAMb1 (Martin *et al.*, 1987), pRE25 (Teuber *et al.*, 2003), y pUW1965 (Werner *et al.*, 2000), así como en transposonones tales como Tn917 (Shaw y Clewell, 1985), Tn1545 (Courvalin y Carlier, 1987), Tn5384 y Tn5385 (Bonafede *et al.*, 1997); usualmente vinculado a otros determinantes de resistencia a antibióticos. En cuanto a los enterococos resistentes a eritromicina y que carecen

de determinantes de resistencia conocidos, aun no queda claro cuales el mecanismo de resistencia adoptado por estas cepas.

En lo referente a la bomba de exporte EfrAB, los resultados indicaron que los genes *efrA* y *efrB* codificadores para dicha bomba estaban presentes mayoritariamente en *E. faecalis* (96%) en comparación con *E. faecium* (13%). Sin embargo, el presente estudio fue pionero en describir la presencia de la bomba de exporte EfrAB en *E. faecium* ya que solamente ha sido descrita en *E. faecalis* por Lee *et al.* (2003), lo cual sugiere la posibilidad de una co-transferencia de los genes de resistencia entre las dos especies de enterococos en los alimentos.

En resumen, nuestros resultados sugieren que los alimentos fermentados de origen animal o vegetal son posibles reservorios de enterococos multirresistentes. Las cepas aisladas en el presente estudio mostraron resistencia a 3 o más antibióticos, hecho que exige un control exhaustivo de estas bacterias. Además, teniendo en cuenta el alto número de enterococos resistentes a antibióticos de uso común, es imprescindible re-evaluar el uso terapéutico de los antibióticos en las granjas tanto en territorio nacional como internacional. Considerando la alta incidencia de enterococos multirresistentes en los alimentos fermentados de origen animal y vegetal, nos pareció interesante completar este estudio mediante el análisis de su perfil de susceptibilidad frente a los biocidas. La disminución de la susceptibilidad a los desinfectantes (tales como clorhexidina y triclosán) o a los antibióticos en las bacterias, es debida a mecanismos específicos e inespecíficos que suelen envolver la acción de bombas de exporte activas o sobre-expresadas (Poole, 2005). *Enterococcus faecalis* es un patógeno oportunista muy resistente capaz de colonizar los ambientes hostiles y resistir a la acción de los antibióticos. La gran robustez y resistencia de *E. faecalis* es parcialmente debida a la presencia de bombas de exporte tales como EmeA que pertenece a la superfamilia MFS y a los transportadores ABC (Jonas *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). Dentro de la familia de los transportadores ABC, EfrAB es un transportador heterodimérico de tipo ABC que ejerce su actividad óptima cuando ambos genes *efrA* y *efrB* se co-expresan (Lubelski *et al.*, 2007). Algunos estudios han mostrado que los sustratos para la bomba de exporte EfrAB en *E. faecalis* son diversos compuestos tóxicos tales como acriflavina, brumuro de etidio, safranina O, DAPI, daunomicina, doxorubicina, novobiocina, arbekacina, doxiciclina y norfloxacin (Davis *et al.*, 2001; Lubelski *et al.*, 2007). Sin embargo, EfrAB se ha detectado también en *E. faecium* aislada de alimentos fermentados como ha sido documentado por primera vez por en el estudio anterior (Valenzuela *et al.*, 2013).

En el presente estudio, a partir de los datos de multirresistencia a antibióticos obtenidos en *E. faecalis* y *E. faecium* aislados de alimentos fermentados, se procedió a determinar la incidencia de tolerancia a biocidas en dichas cepas. Los resultados demostraron que dicha resistencia/tolerancia a ambos antimicrobianos fue dependiente de la especie analizada, y que sólo algunas cepas multirresistentes presentaron los genes *efrA/B* (100% y 12% de *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente). Con el fin de dilucidar si EfrAB está implicada en la resistencia/tolerancia a antibióticos/biocidas, se investigó el nivel de expresión de EfrAB en presencia de diferentes antimicrobianos. Los resultados obtenidos indicaron que la expresión de EfrAB era altamente dependiente de la cepa bacteriana y del antimicrobiano utilizado. Así, algunos antibióticos adicionados a la mitad de la MIC aumentaron la expresión de los genes *efrA* y *efrB*, codificantes de la bomba de exporte EfrAB, tales como fue el caso de gentamicina o estreptomicina en *E. faecalis* Ac 8-2, gentamicina en *E. faecalis* qE-14 y cloranfenicol en *E. faecium* VP5 01, lo cual indica que la expresión de EfrAB fue inducida por dichos antibióticos. En este sentido, podemos sugerir que EfrAB participa en el exporte de cloranfenicol, gentamicina y estreptomicina en las cepas correspondientes, y por consiguiente podría dar lugar a la aparición de resistencias a dichos antibióticos. Sin embargo, no se observó resistencia fenotípica en esas cepas a los antibióticos citados, siendo por lo tanto otros mecanismos implicados en el aumento de la susceptibilidad a los antibióticos mencionados. Por otro lado, la expresión de ARNm de EfrAB disminuyó significativamente con triclosán en *E. faecalis* Ac 8-2, debido probablemente a varias razones tales como la alteración de las rutas de regulación esenciales para la expresión de la bomba de exporte, alteraciones de los componentes estructurales de la bomba de exporte o disrupción de la energía necesaria para la actividad de la bomba como ocurre con otros antimicrobianos en bacterias Gram-negativas (Pagés y Amaral, 2009; Poole y Lomovskaya, 2006). El triclosán es un compuesto fenólico usado en muchos productos de uso diario como pastas de dientes, jabones y lociones (Nester *et al.*, 2007) para inhibir el crecimiento bacteriano al provocar la inhibición de la enoil-ACP reductasa implicada en la biosíntesis de ácidos grasos. Esta interacción puede causar la disrupción de la integridad de la membrana y por lo tanto la inhibición del crecimiento (Ellison y Champlin, 2007). Los datos obtenidos en este estudio indican que la inhibición de EfrAB por triclosán podría deberse a la interacción del biocida con la enoil reductasa asociada a membranas, lo que pudo causar la desorganización de la membrana y por lo tanto obstaculizar la asociación de los componentes de la bomba de exporte EfrAB. Este hecho fue solamente observado en *E. faecalis* Ac 8-2 pero no en *E. faecium*, lo que indica que la disminución de la susceptibilidad a triclosán en *E. faecalis* Ac 8-2 puede implicar otros mecanismos distintos a EfrAB para expulsar el triclosán. Con respecto a este biocida destacar, que el uso racional de

antisépticos con triclosán puede tener un efecto positivo en la prevención de la resistencia/tolerancia a los antimicrobianos al reducir la expresión de EfrAB y consecuentemente disminuir la presión selectiva de los antibióticos causada por el uso sistemático de estos antimicrobianos. Considerando la organización de la membrana y su estructura que son inherentemente dependientes de la cepa bacteriana, los efectos de los antimicrobianos sobre las dianas específicas dependen en gran medida de la cepa ensayada. Estos datos revelan claramente que la interacción de los antimicrobianos con la bomba de exporte EfrAB es específica de la cepa, por lo que en una matriz alimentaria compleja pueden ocurrir diversas interacciones, así, el balance de dichas interacciones refleja el panorama de resistencia observado en bacterias de origen alimentario.

Por otro lado, en el presente estudio hemos explorado el efecto del EDTA sobre EfrAB y los subsiguientes cambios en la susceptibilidad a antimicrobianos y expresión. Nuestros datos revelaron que la adición de una concentración sub-inhibitoria de EDTA (3 mM) redujo las MICs de casi todos los antimicrobianos usados (antibióticos y biocidas). Se observaron elevadas reducciones de las MICs para gentamicina, estreptomicina, clorhexidina y triclosán en presencia de 3 mM EDTA. Esta reducción puede ser debida a un efecto sinérgico de los diferentes antimicrobianos y el EDTA, ya que cuando se adicionó solamente 3 mM de EDTA no causó ninguna inhibición. A nivel molecular, el EDTA es un agente quelante de cationes divalentes de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y tiene también un pequeño efecto sobre las bacterias Gram-positivas, pero sin llegar a incrementar la susceptibilidad a antimicrobianos de acuerdo con estudios previos (Russell y Furr, 1977). El EDTA secuestra cationes divalentes que son nutrientes esenciales para las células bacterianas y también para mantener estructuras celulares (tales como la membrana externa de las bacterias Gram-negativas). Así, la falta de cationes divalentes puede afectar varios procesos celulares, incluyendo la actividad de exporte. Teniendo en cuenta que los niveles de expresión de resistencia a antibióticos pueden depender del estado fisiológico de la célula, las células estresadas por otros factores tales como la baja disponibilidad de cationes divalentes, pueden sufrir alteraciones en la actividad de su sistema de exporte (resultando en la acumulación de altas concentraciones de antibióticos en el citoplasma), pero también en los niveles de expresión/regulación. En este sentido, las células se vuelven más sensibles a los antimicrobianos a los cuales son resistentes bajo condiciones fisiológicas normales.

El secuestro de cationes divalentes por el EDTA puede alterar las funciones de la bomba de exporte EfrAB. Además, la capacidad de unión del EDTA a proteínas tipo transportadores ABC ha sido demostrado en estudios anteriores (Zhang *et al.*, 2007). Una de las razones probables

para la disminución de la MIC observada podría ser la inactivación de la bomba de exporte EfrAB por el EDTA, así se puede producir una acumulación del antimicrobiano dentro de la célula que alteraría las funciones celulares, incluyendo la posible inhibición de la expresión de los genes codificadores de EfrAB. Para confirmar si la inactivación de la bomba EfrAB se debe al descenso de la expresión de los genes codificadores, se estudió la expresión de ARNm bajo las mismas condiciones y los resultados obtenidos demostraron que el EDTA modificó significativamente la expresión de EfrAB en todas las cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* estudiadas. Así, en presencia de 3 mM EDTA se detectó una reducción de entre 10-140 veces en la expresión de los genes correspondientes a las proteínas EfrA y EfrB. La baja regulación de la expresión de ARNm de EfrAB tras el tratamiento con EDTA ocurrió de manera dosis-dependiente desde 1 a 3 mM, obteniéndose los mejores resultados con 3 mM de EDTA. El EDTA es ampliamente usado como conservante en la industria alimentaria debido a su estatus GRAS (Generally Recognized As Safe) aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) desde 1998 (FDA, 1998), y también se utiliza en medicina, ingeniería, agricultura, aplicaciones industriales, cosmética y en productos de cuidado personal. La baja expresión de EfrAB en presencia de EDTA es la principal responsable de la reducción de la MIC de casi todos los antimicrobianos ensayados en este estudio a pH neutro. El efecto del pH sobre las envolturas celulares, sus constituyentes y los genes implicados en el crecimiento y metabolismo ha sido ampliamente documentado en varios estudios, sin embargo, en nuestro caso, no fue posible estudiar el efecto del EDTA sobre la bomba de exporte EfrAB en condiciones ácidas, ya que la combinación de EDTA y pH ácido (pH 5) produjo una inhibición total del crecimiento de las cepas de enterococos. Además, EfrAB mostró más bien una actividad de exporte dependiente de energía que de pH como indicaron Lee *et al.* (2003b) para EfrAB en *E. faecalis* y para MsbA (otra bomba de exporte de la familia de transportadores ABC similar a EfrAB) en *E. coli* (Martins *et al.*, 2011). Por todo ello, podemos confirmar que la bomba de exporte EfrAB está generalmente implicada en el exporte de antibióticos y biocidas (cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, rifampicina, tetraciclina, clorhexidina, triclosán) en enterococos aislados de alimentos fermentados, sin embargo existen diferencias intra- e inter-especies debido a diferencias en la composición y organización de la membrana de cada cepa. Además, los resultados obtenidos en el presente estudio corroboran la importancia de EfrAB en la multirresistencia en cepas de enterococos de origen alimentario.

Por lo tanto, es razonable sugerir que el uso de EDTA a bajas concentraciones (3 mM) debería ser evaluado en los alimentos para evitar la aparición de resistencia a antibióticos relevantes en la clínica, mediados por bombas de exporte, como ocurre en este estudio con

EfrAB en enterococos multirresistentes aislados de alimentos fermentados. La presencia de EDTA aumentó la susceptibilidad a muchos antibióticos y biocidas a los cuales las cepas de enterococos eran resistentes tales como el cloranfenicol y tetraciclina en *E. faecalis* qE-14, y eritromicina y rifampicina en *E. faecium* VP5 01. Además, estudios recientes (Chaudhary y Payasi, 2012; Chaudhary *et al.*, 2012) indicaron que el EDTA como inhibidor de las bombas de exporte aumentó la susceptibilidad de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* a diversos antibióticos al inhibir las bombas de exporte AcrAB-TolC y MexA-MexB-OprM, respectivamente. Este hecho anima al uso de EDTA, a concentraciones indicadas como seguras, no sólo en la industria alimentaria (niveles máximos permitidos de EDTA en alimentos de 800 ppm, que equivalen a 3mM; [www.fda.gov](http://www.fda.gov)) sino también en la clínica (uso del EDTA hasta 3.33 mg/ kg, que corresponde a 12 mM en la administración intravenosa en humanos; Chaudhary *et al.*, 2012), para evitar o minimizar el desarrollo de cepas resistentes a antimicrobianos.

CONCLUSIONES



- 1.- Los psicrótrofos y los pseudomonas son las bacterias más prevalentes en cuanto a resistencia a antibióticos y/o biocidas a lo largo de la cadena de procesamiento de la carne en el matadero de corderos y cabras, seguidos por las bacterias del ácido láctico representadas principalmente por el género *Lactobacillus*.
- 2.- Las salas de sacrificio y despiece fueron las principales fuentes de bacterias resistentes a antibióticos y/o biocidas por lo cual el uso rotatorio de diferentes desinfectantes es recomendable en este ambiente frecuentemente desinfectado.
- 3.- Las superficies del matadero así como los productos cárnicos comerciales pueden servir como grandes reservorios de genes de resistencia a antibióticos especialmente los genes *tet* (*tetA* y *tetB*) los cuales fueron más prevalentes en la sala de sacrificio, sala de despiece y productos finales.
- 4.- Los genes de resistencia a antibióticos fueron diseminados a lo largo de las zonas del matadero, con correlaciones significativas entre diferentes zonas siendo la sala de sacrificio, sala de despiece y la sala blanca las zonas clave para ser controlados con el objetivo de reducir estratégicamente los riesgos de transmisión de los genes de resistencia a antibióticos y minimizar los problemas de seguridad de los alimentos y la contaminación del medio ambiente.
- 5.- Los pseudomonas aislados de las superficies del matadero de corderos y cabras mostraron una multirresistencia a diferentes antibióticos, siendo generalmente resistentes a sulfametoxazol, eritromicina, amoxicilina, ampicilina, cloranfenicol, trimetoprima, rifampicina y ceftazidima (especialmente los mesófilos), así como colistina y tetraciclina (especialmente los psicrótrofos). Sin embargo, fueron sensibles a ciprofloxacino, gentamicina, imipenem y kanamicina.
- 6.- En los pseudomonas se encontró multirresistencia hasta a 13 antibióticos distintos, estando relacionada con mecanismos intrínsecos y adquiridos de resistencia. Además, se detectó una relación entre la presencia de varios genes de resistencia a antimicrobianos especialmente entre los betalactámicos y tetraciclina, trimetoprima y sulfonamidas.
- 7.- La distribución y el análisis basado en el resistoma de los pseudomonas multirresistentes en diferentes zonas del matadero indicaron que las principales fuentes de las cepas idénticas o relacionadas eran los animales y el ambiente del matadero, las cuales fueron diseminadas desde el principio (el ambiente de la entrada) hasta el final.
- 8.- Los pseudomonas aislados de las superficies del matadero de corderos y cabras mostraron resistencia a biocidas especialmente al triclosán, y en menor medida a cetrimida y cloruro de benzalconio dependiendo de la especie. Sin embargo, estos pseudomonas mostraron una alta sensibilidad a las fórmulas industriales de biocidas.

**9.-** Las correlaciones positivas entre antibióticos, biocidas o la combinación de ambos antimicrobianos en pseudomonas indican una co-resistencia o resistencia cruzada entre los diferentes antimicrobianos usados en el matadero o en los animales.

**10.-** La resistencia cruzada entre biocidas y antibióticos en pseudomonas fue detectada especialmente entre PHMG o triclosán y diferentes antibióticos dependiendo del biocida en cuestión y del tipo de población. Así, el uso de estos biocidas como desinfectantes en las diferentes zonas del matadero debe ser considerado debido al efecto de la presión selectiva de los antibióticos en la resistencia que podría emerger y diseminarse hasta el consumidor.

**11.-** Las fórmulas industriales específicas tales como topax 66 y oxonia P3 mostraron pocas correlaciones con los antibióticos (ninguna o de 1-2 antibióticos) las cuales deben ser tomadas en consideración para las prácticas de desinfección en el matadero de corderos y cabras.

**12.-** Los productos fermentados de origen animal y vegetal se mostraron como posibles reservorios de enterococos multirresistentes. Así, se detectaron altos niveles de multirresistencia a antibióticos de importancia clínica en cepas de *E. faecalis* a 6 hasta 7 antibióticos, especialmente aquellos aislados de alimentos de origen animal.

**13.-** La bomba de exporte de tipo ABC EfrAB implicada en la expulsión de diferentes antimicrobianos fue detectada en 96% de cepas de *E. faecalis* y también por primera vez en cepas de *E. faecium* (13%).

**14.-** La resistencia a antibióticos y la tolerancia a biocidas en *E. faecalis* y *E. faecium* aislados de alimentos fermentados tradicionales fueron intra- e inter-especie dependientes y fueron debidos a mecanismos específicos e inespecíficos tales como las bombas de exporte.

**15.-** La expresión de EfrAB fue inducida por gentamicina, estreptomycin y cloranfenicol adicionados a mitad de su concentración mínima inhibitoria (MIC), siendo esta expresión altamente dependiente de la cepa ensayada y del antimicrobiano usado.

**16.-** La bomba de exporte EfrAB juega un papel importante en la expulsión de antimicrobianos y biocidas, lo cual sugiere su implicación en la multirresistencia de los enterococos. La adición de 3mM de EDTA actúa como inhibidor de la bomba de exporte, reduciendo las MICs de casi todos los antimicrobianos mediante la reducción de la expresión de EfrAB (10-140 veces).

CONCLUDING REMARKS

- 1.- Psychrotrophs and pseudomonads were the most prevalent bacteria resistant to biocides and/or antibiotics throughout meat processing chain in lamb and goat slaughterhouse, followed by lactic acid bacteria which were mainly composed by *Lactobacillus* genus.
- 2.- Sacrifice and cutting rooms were the main sources of antibiotic and/or biocide resistant bacteria, thus rotational use of different disinfectants is recommended in an environment that is frequently disinfected.
- 3.- Slaughterhouse surfaces and end products may act as large reservoirs of antibiotic resistance genes mainly *tet* genes (*tetA* y *tetB*), which were more prevalent in sacrifice room, cutting room and meat products.
- 4.- Antibiotic resistance genes were disseminated throughout slaughterhouse zones, with significant correlations between different sampling zones. Sacrifice room, cutting room and white room were the key zones to be controlled with the aim to reduce strategically the risks of antibiotic resistance gene transmission and minimize the issues of food safety and environment contamination.
- 5.- Pseudomonads isolated from goat and lamb slaughterhouse surfaces showed multiresistance to different antibiotics, being generally resistant to sulfamethoxazole, erythromycin, amoxicillin, ampicillin, chloramphenicol, trimethoprim, rifampin, and ceftazidime (especially mesophiles), as well as colistin and tetracycline (especially psychrotrophes). However, they generally were sensitive to ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, and kanamycin regardless of species identity.
- 6.- Multiresistance of Pseudomonads showed multiresistance to up to 13 different antibiotics, including intrinsic and acquired resistance mechanisms. Furthermore, a link between various antimicrobial resistance genes was specially remarkably shown for beta-lactams and tetracycline, trimethoprim, and sulfonamides.
- 7.- The distribution and resistome-based analysis of MDR pseudomonads in different slaughterhouse zones indicated that the main sources of the identical or related pseudomonad strains were the animals and the slaughterhouse environment, being disseminated from the beginning (entrance environment) to the end.
- 8.- Pseudomonads isolated from goat and lamb slaughterhouse surfaces showed mainly resistance to triclosan, and to lesser extent to cetrimide and benzalkonium chloride depending on the species. However, they were highly susceptible to industrial formulation of biocides.
- 9.- Positive correlations between antibiotics, biocides and both antimicrobials in pseudomonads indicated co- or cross resistance between different antimicrobials in goat and lamb slaughterhouse environment and animals.

**10.-** Cross-resistance between biocides and antibiotics in pseudomonads were especially detected between PHMG or triclosan and different antibiotics depending on the biocide and the population type. Thus, the use of those biocides as disinfectant in slaughterhouse zones must be considered because of the selection pressure effect of antibiotics on resistance which could emerge and be spread to the consumer.

**11.-** Specific industrial formulations such as topax 66 and oxonia P3 showed few correlations with antibiotics (none or 1-2 antibiotics) in pseudomonads which should be taken into consideration for disinfection practices in goat and lamb slaughterhouse.

**12.-** Fermented foods of animal and vegetable origin were shown to act as possible reservoirs of multiresistant enterococci. Thus, high levels of multidrug resistance to clinically important antibiotics was detected in *E. faecalis* strains to six up to seven antibiotics, especially those isolated from foods of animal origin.

**13.-** The ABC Multidrug Efflux Pump EfrAB was detected in 96% of *E. faecalis* strains and also for the first time in *E. faecium* strains (13%).

**14.-** Antibiotic resistance and biocide tolerance of *E. faecalis* and *E. faecium* isolated from traditional fermented foods were intra and inter-species dependent and were due to specific and unspecific mechanisms such as efflux pumps.

**15.-** EfrAB expression was induced by half of minimum inhibitory concentration (MIC) of gentamicin, streptomycin and chloramphenicol being this expression highly dependent on the strain tested and on the antimicrobial used.

**16.-** EfrAB plays an important role in the efflux of antibiotics and biocides which suggest its implication in multidrug resistance in enterococci. Addition of 3 mM EDTA act as efflux pump inhibitor reduced the MICs of almost all antimicrobials by decreasing EfrAB expression (10-140 folds).

## REFERENCIAS

- Aarestrup, F.M. 2005. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol* 96,271–81.
- Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M., Jensen, L.B. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diag Microbiol Infect Dis* 37,127–137.
- Aarestrup, F.M., Wegener, H.C., Collignon, P. 2008. Resistance in bacteria of the food chain, Epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 6,733–750.
- Abdel- Malek, S.M.A., Al-Adham, I.S.I., Winder, C.L., Buultjens, T.E.J., Gartland, K.M.A., Collier, P.J. 2002. Antimicrobial susceptibility changes and T-OMP shifts in pyrithione-passaged planktonic cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Applied Microbiology* 92, 729-736.
- Abriouel, H., Lucas, R., Ben Omar, N., Valdivia, E., Maqueda, M., Martinez-Cañamero, M., Gálvez, A., 2005. Enterocin AS-48RJ: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 383–397.
- Aeschlimann, J.R. 2003. The Role of Multidrug Efflux Pumps in the Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and Other Gram-Negative Bacteria Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy* 23,916–924.
- Ahn, Y.T., Lim, K.L., Ryu, J.C., Kang, D.K., Ham, J.S., Jang, Y.H., Kim, H.U., 2002. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* isolated from piglets and chicken. *Asian- Australasian. Journal of Animal Sciences* 15, 1790–1792.
- Allen, M.J., White, G.F., Morby, A.P. 2006. The response of *Escherichia coli* to exposure to the biocide polyhexamethylene biguanide. *Microbiology* 152, 989-1000.
- Allen, H.K., Levine, U.Y., Looft, T., Bandrick, M., Casey, T.A. 2013. Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends in Microbiology* 21, 114-119.
- Andersson, A., Granum, P.E., Ronner, U. 1998. The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *International Journal of Food Microbiology* 39, 93- 99.
- Anthonisen, I.-L., Sunde, M., Steinum, T.M., Sidhu, M.S., Sørum, H., 2002. Organization of the antiseptic resistance gene *qacA* and Tn552-related  $\beta$ -lactamase genes in multidrugresistant *Staphylococcus haemolyticus* strains of animal and human origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 3606–3612.
- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J.C., Peixe, L. 2005. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica*

strains and relation with integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49,836–839.

Aradhya, A.A., Kolhe, R.P., Bhong, C.D., Deshpande, C.D., Lokhande, S.D., Godse, B.N. 2014. Prevalence of antimicrobial resistant pathotypes of *Escherichia coli* in beef cattle and slaughterhouse premise. *African Journal of Microbiology Research*. 8, 277-286.

Arnaut-Rollier, I., Vauterin, L., De-Vos, P., Massart, D.L., Devriese, L.A., De-Zutter, L., Van Hoof, J. 1999. A numerical taxonomic study of the *Pseudomonas* flora isolated from poultry meat. *Journal of Applied Microbiology* 87,15-28.

Auerbach, E.A., Seyfried, E.E., McMahon, K.D. 2007. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Research* 41(5),1143-1151.

Atlas, R.M., Parks, L.C., 1993. *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press, Inc., London.

Ayres, H.M., Payne, D.N., Furr, J.R., Russell, A.D. 1998. Effect of permeabilizing agents on antibacterial activity against a simple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Letters in Applied Microbiology* 27, 79-82.

Azuzena, E., Mobashery, S. 2001. Aminoglycoside- modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. *Drug Resistance Updates* 4, 106-117.

Bean, D.C., Livermore, D.M., Hall, L.M. 2009. Plasmids imparting sulfonamide resistance in *Escherichia coli*: implications for persistence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53,1088–1093.

Behr, H., Reverdy, M.E., Mabelat, C., Freney, J., Fleurette, J., 1994. Relation entre le niveau des concentrations minimales inhibitrices de cinq antiseptiques et la présence du gène qacA. *Pathologie et Biologie* 42, 438–444.

Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M., Franz, C.M., Holzapfel, W.H., Pérez-Pulido, R., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A. 2004. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology* 27,118–130.

Bender, C.L., Alarcon-Chaidez, F., Gross, D.C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63,266–292

Birkett, C., Ludlam, H., Woodford, N., Brown, D., Brown, N., Roberts, M., Milner, N., Curran, M. 2007. Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Journal of Medical Microbiology* 56,52-55.



- Bischoff, M., Bauer, J., Preikschat, P., Schwaiger, K., Molle, G., Holzel, C. 2012. First detection of the antiseptic resistance gene *qacA/B* in *Enterococcus faecalis*. *Microbial Drug Resistance* 18, 7- 12.
- Bloomfield, S.F. 1999. Resistance of bacterial spores to chemical agents. In: Russell, A.D.H., W.B.; Ayliff, G.A.J., (Ed.), *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization.*, 3rd ed. Blackwell Science, Oxford, England.
- Bolhuis, H., Poelarends, G., van Veen, H.W., Poolman, B., Driessen, A.J., Konings, W.N. 1995. The Lactococcal *ImrP* gene encodes a proton motive force-dependent drug transporter. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 26092- 26098.
- Bonafede, M.E., Carias, L.L., Rice, L.B. 1997. Enterococcal transposon Tn5384: Evolution of a composite transposon through cointegration of enterococcal and staphylococcal plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41,1854–1858.
- Borck, B., Pedersen, K., 2005. Pulsed-field gel electrophoresis types of *Campylobacter* spp. in Danish 456 turkeys before and after slaughter. *International Journal of Food Microbiology* 101, 63–72.
- Brady, M.T., Feigin, R.D. 1998. *Pseudomonas* and related species, p 1401-1413. In Feigin RD, Cherry JD (eds), *Textbook of pediatric infectious diseases*. Saunders WB, Philadelphia, U.S.A.
- Breidenstein, E.B.M., de la Fuente-Nuñez, C., Hancock, R.E. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology* 19,419-426
- Broadley, S.J., Jenkins, P.A., Furr, J.R., Russell, A.D. 1995. Potentiation of the effects of chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride on mycobacteria by ethambutol. *Journal of Medical Microbiology* 43, 458-460.
- Brown, D.F., Brown, N.M., Cookson, B.D., Duckworth, G., Farrington, M., French, G.L., King, L., Lewis, D., Livermore, D.M., Macrae, B., Scott, G.M., Williams, D., Woodford, N. 2006. National glycopeptideresistant enterococcal bacteraemia surveillance Working Group report to the Department of Health–August 2004. *Journal of Hospital Infection* 62,1–27.
- Broxton, P., Woodcock, P.M., Heatley, F., Gilbert, P. 1984. Interaction of some polyhexamethylene biguanides and membrane phospholipids in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology* 57, 115- 124.
- Brtkova, A., Bujdakova, H. 2009. Antibiotic resistance in *Enterococcus* isolates from poultry swabs in Slovakia. *Journal of Food and Nutrition Research* 48, 121-128.
- Bruchmann, J., Kirchen, S., Schwartz, T. 2013. Sub-inhibitory concentrations of antibiotics and wastewater influencing biofilm formation and gene expression of multi-

resistant *Pseudomonas aeruginosa* wastewater isolates. Environmental Science and Pollution Research 20,3539–3549.

Cabo, M.L., Herrera, J.J., Crespo, M.D., Pastoriza, L., 2009. Comparison among the effectiveness of ozone, nisin and benzalkonium chloride for the elimination of planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* CECT4459 on polypropylene. Food Control 20, 521–525.

Cervinkova, D., Babak, V., Marosevic, D., Kubikova, I., Jaglic, Z. 2013. The role of the *qacA* gene in mediating resistance to quaternary ammonium compounds. Microbial Drug Resistance 19, 160- 167.

Ciusa, M.L., Furi, L., Knight, D., Decorosi, F., Fondi, M., Raggi, C., Rosado Coelho, J., Aragonés, L., Moce, L., Visa, P., Freitas, A.T., Baldassarri, L., Fani, R., Viti, C., Orefici, G., Martinez, J.L., Morrissey, I., Rinaldo Oggioni, M., the BIOHYPO Consortium, 2012. A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus*. International Journal of Antimicrobial Agents 40, 210–220.

Clardy, J., Fischbach, M.A., Currie, C.R. 2009. The natural history of antibiotics. Current Biology 19, 437- 441.

Claus, D., Berkeley, R.C.D. 1986. Genus *Bacillus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Cloete, T.E. 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. International Biodeterioration & Biodegradation 51, 277-282.

CLSI, 2009. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

CLSI, 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 22nd informational supplement. CLSI document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Conde-Estevez, D., Grau, S., Albanell, J., Terradas, R., Salvado, M., Knobel, H., 2011. Clinical characteristics and outcomes of patients with vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* bacteraemia in cancer patients. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 30, 103- 108.

Coque, T.M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Baquero, F., Cantón, R., Nordmann, P. 2008. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. Emerging Infectious Diseases. 14,195–200.

- Cosgrove, S.E., 2006. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clinical Infectious Diseases* 42, S82- 89.
- Couce, A., Blazquez, J. 2009. Side effects of antibiotics on genetic variability. *FEMS Microbiology Reviews* 33,531-538.
- Courvalin, P., Carlier, C. 1987. Tn1545: A conjugative shuttle transposon. *Molecular and General Genetics* 206,259–264.
- Creti, R., Koch, S., Fabretti, F., Baldassarri, L., Huebner, J., 2006. Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides. *BMC Microbiology* 6, 60.
- Champlin, F.R., Ellison, M.L., Bullard, J.W., Conrad, R.S. 2005. Effect of outer membrane permeabilisation on intrinsic resistance to low triclosan levels in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26, 159-164.
- Chaudhary, M., Payasi, A., 2012. Ethylenediaminetetraacetic acid: a non antibiotic adjuvant enhancing *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility. *African Journal of Microbiology Research* 6, 6799- 6804.
- Chaudhary, M., Kumar, S., Payasi, A., 2012. A novel approach to combat acquired multiple resistance in *Escherichia coli* by using EDTA as efflux pump inhibitor. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 4, 126- 130.
- Chen, Y., Knabel, S.J., 2007. Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *L. monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6299–6304.
- Chopra, I., Robets, M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, 232- 260.
- Chopra, I., Johnson, S.C., Bennett, P.M. 1987. Inhibition of *Providencia stuartii* cell envelope enzymes by chlorhexidine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 19, 743-751.
- Chouchani, C., El Salabi, A., Marrakchi, R., Ferchichi, L., Walsh, T.R. 2012. First report of *mefA* and *msrA/msrB* multidrug efflux pumps associated with *blaTEM-1* b-lactamase in *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Infectious Diseases* 16,e104–e109.
- Chroma, M., Kolar, M. 2010. Genetic methods for detection of antibiotic resistance: focus on extended- spectrum betalactamases. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Republic* 154, 28- 296.

- Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T.T., Becher, A., Karkhoff-Schweitzer, R.R., Schweizer, H.P., 2001. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosán selects for nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 428–432.
- Dancey, C., Reidy, J. 2004. *Statistics without Maths for Psychology: using SPSS for Windows*, London, Prentice Hall.
- Davies, J., Davis, B.D. 1968. Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. *Journal of Biological Chemistry* 243, 3312- 3316
- Davies, J., Davies, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74,417–433.
- Davis, D.R., McAlpine, J.B., Pazoles, C.J., Talbot, M.K., Alder, E.A., White, C., Jonas, B.M., Murray, B.E., Weinstock, G.M., Rogers, B.L., 2001. *Enterococcus faecalis* multidrug resistance transporters: application for antibiotic discovery. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 3, 179- 184.
- De Gheldre, Y., Avesani, V., Berhin, C., Delmee, M., Glupczynski, Y. 2003. Evaluation of Oxoid combination discs for detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52, (4), 591-597.
- de Jong, A., Bywater, R., Butty, P., Deroover, E., Godinho, K., Klein, U., Marion, H., Simjee, S., Smets, K., Thomas, V., Valle, M., Wheadon, A. 2009. A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy foodproducing animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63,733–744.
- de la Iglesia, A.I., Morbidoni; H.R. 2006. Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos. *Revista Argentina de Microbiología*, 38 (2), 97-109.
- De los Reyes-Gavilan, C.G., Limsowtin, G.K.Y., Tailliez, P., Séchaud, L., Acholas, J.P., 1992. A *Lactobacillus helveticus*-specific DNA probe detects restriction fragment length polymorphisms in this species. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3429- 3432.
- de Oliveira, K.M., dos S Júlio, P.D., Grisolia, A.B. 2013. Antimicrobial susceptibility profile of *Pseudomonas* spp. isolated from a swine slaughterhouse in Dourados, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revista Argentina de Microbiología* 45,57-60.
- de Toro- Hernando, M. 2013. Resistencia a betalactámicos y fluorquinolonas en *Salmonella enterica*. Mecanismos moleculares y elementos de movilización génica. Tesis doctoral, Universidad de La Rioja, Logroño.

- De Vos, P. 2002. Nucleic acid analysis and SDS- PAGE of whole cell proteins in *Bacillus* taxonomy. Applications and systematic of *Bacillus* and relatives. Blackwell Science LTD, Oxford, UK.
- Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal* 324, 1-18.
- Deeth, H.C., Fitz-Gerald, C.H. 1983. Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products, p 195-239. *In* Fox PF (ed), *Developments in dairy chemistry*. Applied Science, London
- DeFlaun, M.F., Levy, S.B. 1989. Genes and their varied hosts, p 1-32. *In* Levy SB, Miller RV (ed), *Gene transfer in the environment*. McGraw-Hill, New York.
- Denyer, S.P. 1995. Mechanism of action of antibacterial biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation* . 36, 227- 244.
- Denyer, S.P., Maillard, J.Y. 2002. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 92, 35S-45S.
- Dever, L.L. 2000. Emerging antibiotic resistance in nosocomial pathogens. *In*: RT: For Decision Makers in Respiratory Care.
- Directiva 98/8/CE del Parlamento y del Consejo del 16 de febrero de 1998 relativa a la comercialización de biocidas.
- Dixon, B., 2000. Antibiotics as growth promoters: risks and alternatives. *ASM News* 66, 264–265.
- Doyle, M.P., Beuchat, L. 2007. *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*. Third edition. ASM Press, New York, Washington DC.
- Duché, O., Tremoulet, F., Glasser, P., Labadie, J. 2002. Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1491-1498.
- Duprè, I., Zanetti, S., Schito, A.M., Fadda, G., Sechi, L.A. 2003. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *Journal of Medical Microbiology* 52,491–498.
- Durán, G.M., Marshall, D.L. 2005. Ready-to-eat shrimp as an international vehicle of antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Food Protection* 68,2395–2401.
- Dutka-Malen, S., Evers, S., Courvalin, P., 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant *Enterococci* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 24–27.

Eaton, T.J., Gasson, M.J., 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 1628- 1635.

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. 2014. Suiveillance of antimicrobial consumption in Europe in 2011.

Edmond, M.B., Wallace, S.E., McClish, D.K., Pfaller, M.A., Jones, R.N., Wenzel, R.P., 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a threeyear analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 29, 239- 244.

EFSA, (European Food Safety Authority), 2008. Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA Journal* 732, 1–15.

EFSA, (European Food Safety Authority). 2010a. Scientific Report. 2010. The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004-2007. *EFSA Journal* 8,1309.

EFSA, (European Food Safety Authority). 2010b. Community summary reports on trend and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and food borne outbreaks in the European Union 2008. *EFSA Journal* 8,1496.

EFSA, (European Food Safety Authority), 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal* 10, 2740 (Available online:). [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu).

Ehling-Schulz, M., Guinebretiere, M.H., Monthan, A., Berge, O., Fricker, M., Svensson, B. 2006. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters* 260, 232- 240.

Ehrlich, J., Bartz, Q.R., Smith, R.M. 1947. Chloromycetin: a new antibiotic from soil actinomycete. *Science* 106, 417.

Ellison, M.L., Champlin, F.R., 2007. Outer membrane permeability for nonpolar antimicrobial agents underlies extreme susceptibility of *Pasteurella multocida* to the hydrophobic biocide triclosan. *Veterinary Microbiology* . 124, 310- 318.

Enne, V.I., Livermore, D.M., Stephens, P., Hall, L.M.C. 2001. Persistence of sulfonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *The Lancet* 357,1325–1328.

Enne, V.I., Bennett, P.M., Livermore, D.M., Hall, L.M. 2004. Enhancement of host fitness by the *sul2*-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53,958–63.

- Ercolini, D., Russo, F., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., Villani, F. 2007. Simultaneous Detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from Meat by Use of a Multiplex PCR Assay Targeting the *carA* Gene. Applied and Environmental Microbiology. 73,2354–2359.
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P., Villani, F., 2009. Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. Applied and Environmental Microbiology 75, 1990–2001.
- Escolar, M., Azanza, J.R., Cárdenas, E., Muñoz, M.J. 2001. Quinupristina/Dalfopristina. Revista Médica de la Universidad de Navarra, 45 ), 43-54.
- Evans, D.J., Evans, D.G., DuPont, H.L. 1979. Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic Escherichia coli determined with human, bovine, chicken, and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. Infection and Immunity 23, 336- 346.
- Fang, C.T., Chen, H.C., Chuang, Y.P., Chang, S.C., Wang, J.T. 2002. Cloning of a cation efflux pump gene associated with chlorhexidine resistance in Klebsiella pneumoniae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46, 2024-2028.
- Farber, J.M., Daley, E., Holley, R., Osborne, W.R. 1993. Survival of *Listeria monocytogenes* during the production pf uncooked german, American and Italian style fermented sausages. Food Microbiology 10, 123- 132.
- Fazlara, A., Ekhtelat, M., 2012. The disinfectant effects of benzalkonium chloride on some important foodborne pathogens. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences 12, 23–29.
- FDA (Food and Drug Administration). 1998. Food Additive Safety Profiles of Tetrasodium EDTA, Disodium EDTA, Calcium Disodium EDTA, and Dipotassium EDTA. FDA Database. FDA, Washington, DC.
- Feinman, S.E., 1999. Antibiotics in animal feeds—drug resistance revisited. ASM News 64, 24–29.
- Fellows, P. 2005. Los alimentos: su elaboración y transformación. In: FAO, Dirección de Sistemas de Apoyo a la Agricultura, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (Ed.), Folleto de la FAO sobre diversificación 5, Roma.
- Fernández-Fuentes, M.A., Ortega Morente, E., Abriouel, H., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., 2012. Isolation and identification of bacteria from organic foods: sensitivity to biocides and antibiotics. Food Control 26, 73- 78.
- Filipová, M., Bujdákova, H., Drahovská, H., Lisková, A., Hanzen, J. 2006. Occurrence of aminoglycoside-modifying-enzyme genes *aac*(6′)–*aph*(2′′), *aph*(3′),

ant(4') and ant(6) in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* resistant to high-level of gentamicin and amikacin. *Folia Microbiologica (Praha)* 51,57–61.

Finnegan, M., Linley, E., Denyer, S.P., McDonnell, G., Simons, C., Maillard, J. 2010. Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: Differences between liquid and gas forms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 2108-2115.

Fitzgerald, K.A., Davies, A., Russell, A.D. 1989. Uptake of <sup>14</sup>C-chlorhexidine diacetate to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and its release by azolectin. *FEMS Microbiology Letters* . 51, 327- 332.

Florez, A.B., Ammor, M.S., Mayo, B. 2008. Identification of *tet(M)* in two *Lactococcus lactis* strains isolated from a Spanish traditional starter-free cheese made of raw milk and conjugative transfer of tetracycline resistance to lactococci and enterococci. *International Journal of Food Microbiology* 121,189-194.

Fontana, C., Gazzola, S., Cocconcelli, P.S., Vignolo, G. 2009. Population structure and safety aspects of *Enterococcus* strains isolated from artisanal dry fermented sausages produced in Argentina. *Letters in Applied Microbiology* 49,411–414.

Forsberg, K.J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E.M., Sommer, M.O.A., Dantas, G. 2012. The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. *Science* 337, 1107-1111.

Foulquié- Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De- Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106,1–24.

Franz, C.M., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* 47,1–24.

Franz, C.M., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzapfel, W.H. 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology* 67,4385–4389.

Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H., 2003. Enterococci in foodsda conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* . 88, 105- 122.

Fraser, J.A., Sperber, W.H., 1988. Rapid detection of *Listeria* sp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. *Journal of Food Protection* 51, 762–765.

Fraud, S., Hann, A.C., Maillard, J.Y., Russell, A.D. 2003. Effects of ortho-phthalaldehyde, glutaraldehyde and chlorhexidine diacetate on *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* strains with modified permeability. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51, 575-584.



- Garcia-Lopez, I., Otero, A., Garcia-Lopez, M-L., Santos, J.A. 2004. Molecular and phenotypic characterization of nonmotile Gram-negative bacteria associated with spoilage of freshwater fish. *Journal of Applied Microbiology* . 96,878-886.
- Gardner, F.J., Peel, M.M. 1998. Sterilization, disinfection and infection control. In: Livinstone, C., (Ed.). Harcourt Brace and Company, Melbourne.
- Gasser, F. 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infection. *Bulletin de l'Institut Pasteur* 92, 45- 67.
- Gaze, W.H., Abdousslam, N., Hawkey, P.M., Wellington, E.M. 2005. Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49,1802-7.
- Gennari, M., Dragotto, F. 1992. A study of the incidence of different fluorescent *Pseudomonas* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water. *Journal of Applied Bacteriology* 72,281-8.
- Gevers, D., Danielsen, M., Huys, G., Swings, J. 2003. Molecular characterization of tet(M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented sausage. *Applied and Environmental Microbiology* 69,1270–1275.
- Gilbert, P., Allison, D.G., McBain, A.J., 2002. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance. *Journal of Applied Microbiology* 92, 98s–110s.
- Gilbert, P., Moore, L.E. 2005. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology* 99, 703-715.
- Gill, C.O. 2003. Active packaging in practice: meat, p 378-396. *In* Ahvenainen H (ed), Novel food packaging technology. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Boca Raton, FL.
- Giolitti, C., Cantoni, C., 1966. A medium for the isolation of staphylococci from foodstuffs. *Journal of Applied Bacteriology* 29, 395–398.
- Giraffa, G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews* 26,163–171.
- Giraffa, G., Carminati, D., Neviani, E. 1997. Enterococci isolated from dairy products: A review of risks and potential technological use. *Journal of Food Protection* 60,732–738.
- Giraud, E., Baucheron, S., Cloeckaert, A. 2006. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes and Infection* . 8, 1937- 1944.
- Goldberg, I.H. 1965. Mode of action of antibiotics. Drugs affecting nucleic acid and protein synthesis. *The American Journal of Medicine* 39, 722, 752.

- Gow, S.P., Walder, C.L., Harel, J., Boerlin, P. 2008. Associations between antimicrobial resistance genes in fecal generic *Escherichia coli* isolates from cow-calf herds in western Canada. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 3658- 3666.
- Grady, R., Hayes, F. 2003. Axe–Txe, a broad-spectrum proteic toxin– antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate of *Enterococcus faecium*. *Molecular Microbiology* 47,1419– 1432.
- Granum, P.E. 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 76, 61S- 66S.
- Granum, P.E. 1997. *Bacillus cereus*. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington DC.
- Gregova, G., Kmetova, M., Kmet, V., Venglovsky, J., Feher, A. 2012. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from a poultry slaughterhouse. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 19,75-77.
- Greig, J., Edwards, C., Wallis, M., Jenks, P., Cunningham, R., Keenan, J. 2007. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients admitted with fractured neck of femur. *The Journal of Hospital Infection* 66 (2), 187-189.
- Guardabassi, L., Stegger, M., Skov, R. 2007. Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 in Danish slaughter pigs. *Veterinary Microbiology* . 122,384-386.
- Guerin, E., Cambray, G., Da-Re, S., Mazel, D., Ploy, M.C. 2010. The SOS response controls antibiotic resistance by regulating the integrase of integrons. *Médecine Sciences (Paris)*. 1,28- 30.
- Guérin-Méchin, L., Leveau, J.-Y., Dubois-Brissonnet, F., 2004. Resistance of spheroplasts and whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* to bactericidal activity of various biocides: evidence of the membrane implication. *Microbiological Research* 159, 51–57.
- Gutmann, L., Williamson, R., Moreau, N. 1985. Cross-resistance to nalidixic acid, trimethoprim, and chloramphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia*. *The Journal of Infectious Diseases* 151, 501– 507.
- Haeggman, S., Lofdahl, S., Paauw, A., Verhoef, J., Brisse, S., 2004. Diversity and evolution of the class a chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 2400–2408.
- Hammerum, A., Heuer, O. 2009. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*. 48,916–921.
- Hammerum, A.M., Sandvang, D., Andersen, S.R., Seyfarth, A.M., Porsbo, L.J., Frimodt-Moller, N., Heuer, O.E. 2006. Detection of sul1, sul2 and sul3 in sulphonamide

resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. International Journal of Food Microbiology 106,235–237.

Hanson, N.D., Thomson, K.S., Moland, E.S., Sanders, C.C., Berthold, G., Penn, R.G., 1999. Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumonia* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 44, 377–380

Hawkey, P.M. 2003. Mechanisms of quinolone action and microbial response. Journal of Antimicrobial Chemotherapy . 51, 29- 35.

Hawkey, P.M. 2004. Mycobactericidal agents. In: Fraiese, A.P., Lambert, P.A., Maillard, J.Y., (Eds.), Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization, 4th ed. Blackwell Scientific, Oxford. 191- 204.

Heinzel, M. 1998. Phenomena of biocide resistance in microorganisms. International Biodeterioration and Biodegradation 41, 225–234.

Heir, E., Sundheim, G., Holck, A.L. 1999a. The qacG gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. Journal of Applied Microbiology 86, 378- 388.

Heir, E., Sundheim, G., Holck, A.L., 1999b. Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistant staphylococci from the food industry. International. Journal of Food Microbiology 48, 211–219.

Henwood, C.J., Livermore, D.M., James, D., Warner, M. 2001. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of a UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 47,789-99.

Hernández- Rodríguez, Á. 2006. Aportaciones al estudio de la actividad antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.

Hershberger, E., Oprea, S.F., Donabedian, S.M., Perri, M., Bozigar, P., Bartlett, P., Zervos, M.J. 2005. Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 55,127–130.

Hiom, S.J., Furr, J.R., Russell, A.D., Dickinson, J.R. 1992. Effects of chlorhexidine diacetate on *Candida albicans*, *C. glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Applied Bacteriology 72, 335- 340.

Hoobs, B.C., Gilbert, R.J. 1974. Microbiological counts in relation to food poisoning. Proceedings of the IVth International Congress of Food Science and technology.

Hosokawa, K., Park, N-H., Inaoka, T., Itoh, Y., Ochi, K. 2002. Streptomycin-resistant (*rpsL*) or rifampicin-resistant (*rpoB*) mutation in *Pseudomonas putida* KH146-2

confers enhanced tolerance to organic chemicals. *Environmental Microbiology* 4,703–712.

Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. 2003. Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology* 88,223–233.

Hugo, W.B. 1967. The mode of action of antibacterial agents. *Journal of Applied Bacteriology* 30, 17-50.

Hugo, W.B., 1977. Phenols: a review of their history and development as antimicrobial agents. *Microbios* 23, 83–85.

Hugo, W.B., 1978. Early studies in the evaluation of disinfectants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 4, 489–494.

Hugo, W.B., 1981. The mode of action of antiseptics. In: Weuffen, W., Kramer, A., Gröschel, D., Berencsi, G., Bulka, E. (Eds.), *Handbüch der Antiseptik*. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, pp. 39–77.

Hugo, W.B., 1991a. A brief history of heat and chemical preservation and disinfection. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 9–18.

Hugo, W.B. 1991b. The degradation of preservatives by microorganisms. *International Biodeterioration* 27, 185-194.

Hummel, A., Holzapfel, W.H., Franz, C.M. 2007a. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology* 30,1–7.

Hummel, A.S., Hertel, C., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., 2007b. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 730e739.

Huys, G., D'Haene, K., Collard, J.M., Swings, J. 2004. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Applied and Environmental Microbiology* 70,1555–1562.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications). 2000. *Microorganisms de los alimentos 1. Su significado y metodos de enumeración*. Editorial Acribia, Zaragoza.

Ikeda, T., Tazuke, S., Watanabe, M. 1983. Interaction of biologically active molecules with phospholipid membranes. I. Fluorescence depolarization studies on the effect of polymeric biocide bearing biguanide groups in the main chain. *Biochimica et Biophysica Acta* 23, 380- 386.

Ikeda, T., Ledwith, A., Bamford, C.H., Hann, R.A. 1984. Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 769, 57-66.

- Ikedo, T., Tazuke, S., Bamford, C.H., Ledwith, A. 1985. Spectroscopic studies on the interaction of polymeric in-chain biguanide biocide with phospholipid membranes as probed by 8-anilinonaphthalene-1-sulfonate. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 58, 705-709.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. *Modern Food Microbiology*. Seventh Edition. Food Science Text Series. Springer, New York.
- Jensen, L.B., Ahrens, P., Dons, L., Jones, R.N., Hammerum, A.M., Møller Aarestrup, F., 1998. Molecular analysis of Tn1546 in *Enterococcus faecium* isolated from animals and humans. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 437–442.
- Jensen, L.B., Frimodt-Møller, N., Aarestrup, F.M. 1999. Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiology Letters* 170,151–158.
- Jeong, J.H., Shin, K.S., Lee, J.W., Park, E.J., Son, S.Y., 2009. Analysis of a novel class 1 integron containing metallo-lactamase gene VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology* 47, 753–759.
- Jonas, B.M., Murray, B.E., Weinstock, G.M., 2001. Characterization of *emeA*, a NorA homolog and multidrug resistance efflux pump, in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45, 3574- 3579.
- Juan, C., Zamorano, L., Mena, A., Albertí, S., Pérez, J.L., Oliver, A. 2010. Metallo- $\beta$ -resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65,474-478.
- Jurkovic, D., Krizková, L., Sojka, M., Belicová, A., Dusinský, R., Krajcovic, J., Snauwaert, C., Naser, S., Vandamme, P., Vancanneyt, M. 2006. Molecular identification and diversity of enterococci isolated from Slovak Bryndza cheese. *Journal of General and Applied Microbiology* 52,329–337.
- Kacmaz, B., Aksoy, A. 2005. Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. *International Journal of Antimicrobial Agents* 25,535–538.
- Kayser, F.H., 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology* . 88, 255- 262.
- Khan, A.A., Nawaz, M.S., Khan, S.A., Steele, R. 2002. Detection and characterization of erythromycin-resistant methylase genes in Gram-positive bacteria isolated from poultry litter. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59,377–381.
- Kim, M., Kwon, T.H., Jung, S.M., Cho, S.H., Jin, S.Y., Park, N.H., Kim, C.G., Kim, J.S. 2013. Antibiotic Resistance of Bacteria Isolated from the Internal Organs of Edible Snow Crabs. *PLoS One*. 8,e70887.

- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E., 1954. Media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine 44, 301–307.
- Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M.A., Altermann, E. 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. FEMS Microbiology Reviews 29, 393- 409.
- Klare, I., Werner, G., Witte, W. 2002. Enterococci. Habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics. In: Emerging Bacterial Pathogens, Contributions to Microbiology. Mühldorfer I, Schäfer KP (eds.). Basel: Karger, 2002, pp. 108–122.
- Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G., Witte, W. 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in Enterococcus faecium. International Journal of Food Microbiology 88,269–290.
- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W., Goossens, H. 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 59,900– 688 912.
- Knapp, C.W., Dolfing, J., Ehlert, P.A.I., Graham, D.W.. 2010a. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. Environmental Science and Technology 44,580-587
- Knapp, C.W., Zhang, W., Sturm, B.S., Graham, D.W. 2010b. Differential fate of erythromycin and beta-lactam resistance genes from swine lagoon waste under different aquatic conditions. Environmental Pollution . 158,1506-12.
- Kojima, A., Morioka, A., Kijima, M., Ishihara, K., Asai, T., Fujisawa, T., Tamura, Y., Takahashi, T. 2010. Classification and antimicrobial susceptibilities of Enterococcus species isolated from apparently healthy food-producing animals in Japan. Zoonoses Public Health 57,137–141.
- Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C., Huebner, J., 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. Vaccine 22, 822-830.
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Haapasalo, M. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. Microbes and Infection 2, 189- 198.
- Kotra, L.P., Haddad, J., Mobashery, S. 2000. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance.. Antimicrobials Agents and Chemotheraphy 44, 3249, 3256.
- Köljalg, S., Naaber, P., Mikelsaar, M., 2002. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. The Journal of Hospital Infection 51, 106–113.

- Kozak, G.K., Pearl, D.L., Parkman, J., Reid-Smith, R.J., Deckert, A., Boerlin, P. 2009. Distribution of sulfonamide resistance genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from swine and chickens at abattoirs in Ontario and Quebec, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*. 75,5999–6001.
- Kraft, A.A., 1992. Psychrotrophic Bacteria in Foods: Disease and Spoilage. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Krocko, M., Canigová, M., Ducková, V., Artimová, A., Bezeková, J., Poston, J. 2011. Antibiotic resistance of Enterococcus species isolated from raw foods of animal origin in south west part of Slovakia. *Czech Journal of Food Sciences* 29,654–659.
- Kuo, M.R., Morbidoni, H.R., Alland, D., Sneddon, S.F., Gourlie, B.B., Staveski, M.M., Leonard, M., Gregory, J.S., Janjigian, A.D., Yee, C., Musser, J.M., Kreiswirth, B., Iwamoto, H., Perozzo, R., Jacobs, W.R., Sacchettini, J.C., Fidock, D.A. 2003. Targeting Tuberculosis and Malaria through Inhibition of Enoyl Reductase: Compound activity and structural data. *Journal of Biological Chemistry* 278, 20851-20859.
- Kuyyakanond, T., Quesnel, L.B. 1992. The mechanism of action of chlorhexidine. *FEMS Microbiology Letters* . 100, 211- 215.
- Labadie, J. 1999. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science* . 52,299-305.
- Lambert, P.A. 2002. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 92, suppl: 46S- 54S.
- Lambert, P.A., Hammond, S.M. 1973. Potassium fluxes, first indications of membrane damage in micro organisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 54, 796-799.
- Latham, M.C. 2002. Nutrición Humana en el mundo en desarrollo. In: FAO, O.d.I.N.U.p.I.A.y.I.A., (Ed.), Colección FAO: Alimentación y Nutrición nº 29., Roman.
- Lavilla- Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A., Abriouel, H., 2013. Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *International Journal of Food Microbiology* 161, 97-106.
- Lavilla- Lerma, L., Benomar, N., Valenzuela, A.S., Casado- Muñoz, M.D.C., Gálvez, A., Abriouel, H. 2014a. Role of EfrAB in biocide and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from traditional fermented foods and the effect of EDTA as EfrAB inhibitor. *Food Microbiology* 44, 249-257
- Lavilla- Lerma, L., Benomar, N., Casado Muñoz, M.D., Gálvez, A., Abriouel, H. 2014b. Antibiotic multi-resistance analysis of mesophilic and psychrotrophic

*Pseudomonas* sp. isolated from goat and lamb slaughterhouse surfaces throughout meat chain production. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM.01998-14

Leavis, H.L., Bonten, M.J.M., Willems, R.J.L. 2006. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: Global dispersion and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* 9,454–460.

Leclercq, R. 2009. Epidemiological and resistance issues in multidrugresistant staphylococci and enterococci. *Clinical Microbiology and Infection* 15,224–231.

Lee, A., Mao, W., Warren, M.S., Mistry, A., Hoshino, K., Okamura, R., Ishidam H., Lomovskaya, O. 2000. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. *Journal of Bacteriology* 182, 3142- 3150.

Lee, E.W., Chen, J., Huda, M.N., Kuroda, T., Mizushima, T., Tsuchiya, T., 2003a. Functional cloning and expression of *emeA*, and characterization of EmeA, a multidrug efflux pump from *Enterococcus faecalis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26, 266- 270.

Lee, E.W., Huda, M.N., Kuroda, T., Mizushima, T., Tsuchiya, T. 2003b. EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47,3733–3738.

Leng, Z., Riley, D.E., Berger, R.E., Krieger, J.N., Roberts, M.C. 1997. Distribution and mobility of the tetracycline resistant determinant Tet Q. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 40,551–559.

Leshner, G.Y., Froelich, E.J., Gruett, M.D., Bailey, J.H., Brundage, R.P. 1962. 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapyapeutic Agents. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* 5, 1063-1065.

Lester, C.H., Frimodt-Møller, N., Sørensen, T.L., Monnet, D.L., Hammerum, A.M. 2006. In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50,596–599.

Leung, J.W., Liu, Y.L., Desta, T.D., Libby, E.D., Inciardi, J.F., Lam, K., 2000. In vitro evaluation of antibiotic prophylaxis in the prevention of biliary stent blockage. *Gastrointestinal Endoscopy* 51, 296- 303.

Levine, D.P., 2006. Vancomycin: a history. *Clinical Infectious Diseases*. 42, S5-S12.

Levy, S.B., 1997. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. *Ciba Foundation Symposium* 207, 1–9.

Levy, S.B., 1998. The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American* 278, 22–39.



- Levy, S.B., 2002. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology* 92, 65s–71s.
- Li, X-Z., Livermore, D.M., Nikaido, H. 1994. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to tetracycline, chloramphenicol and norfloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 38,1732- 1741.
- Lindsay, D., Oosthuizen, M.C., Brozel, V.S., von Holy, A. 2002. Adaptation of a neutrophilic dairy-associated *Bacillus cereus* isolate to alkaline pH. *Journal of Applied Microbiology* 92, 81- 89.
- Lindsay, D., Brozel, V.S., Von Holy, A. 2006. Biofilm-spore response in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* during nutrient limitation. *Journal of Food Protection* 69, 1168- 1172.
- Lorian, V. 1989. In vitro simulation of in vivo conditions: physical state of the culture medium. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 2403- 2406.
- Lubelski, J., Konings, W.N., Driessen, A.J., 2007. Distribution and physiology of ABCtype transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71, 463- 476.
- Lynne, A.M., Kaldhone, P., David, D., White, D.G., Foley, S.L. 2009. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolated from food animals. *Foodborne Pathogens and Disease* . 6,207-15.
- Ma, D., Cook, D.N., Hearst, J.E., Nikaido, H., 1994. Efflux pumps and drug resistance in gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology* 2, 489–493.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2004. Brock: Biología de los microorganismos, 10ª edición. Pearson.
- Magee, J.T., Pritchard, E.L., Fitzgerald, K.A., Dunstan, F.D.J., Howard, A.J., 1999. Antibiotic prescribing and antibiotic resistance in community practice: retrospective study, 1996–8. *British Medical Journal* 319, 1239–1240.
- Majiduddin, F.K., Materon, I.C., Palzkill, T.G. 2002. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *International Journal of Food Microbiology* 292, 127- 137.
- Manzoor, S.E., Lambert, P.A., Griffiths, P.A., Gill, M.J., Fraise, A.P. 1999. Reduced glutaraldehyde susceptibility in *Mycobacterium chelonae* associated with altered cell wall polysaccharides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* . 43, 759- 765.
- Marakova, K.S., Koonin, E.V. 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology* 189, 1199- 1208.
- Marcos, J.Y., Soriano, A.C., Salazar, M.S., Moral, C.H., Ramos, S.S., Smeltzer, M.S., Carrasco, G.N., 1999. Rapid identification and typing of *Staphylococcus*

*aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. Journal of Clinical Microbiology 37, 570–574.

Marin, M., Gudiol, F. 2003. Beta-Lactam antibiotics. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 21, 42- 55.

Martin, B., Alloing, G., Méjean, V., Claverys, J.P. 1987. Constitutive expression of erythromycin resistance mediated by the *ermAM* determinant of plasmid pAM beta 1 results from deletion of 50 leader peptide sequences. Plasmid 18, 250–253.

Martín-Platero, A.M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. 2009. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. International Journal of Food Microbiology . 132, 24-32.

Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Jacoby, G.A. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. The Lancet. 351(9105),797-799.

Martins, A., Machado, L., Costa, S., Cerca, P., Spengler, G., Viveiros, M., Amaral, L., 2011. Role of calcium in the efflux system of *Escherichia coli*. International Journal of Antimicrobial Agents 37, 410- 414.

Mayer, S., Boos, M., Beyer, A., Fluit, A.C., Schmitz, F.J., 2001. Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant European isolates of *Staphylococcus aureus*. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 47, 896–897.

McBride, S.M., Fischetti, V.A., Leblanc, D.J., Moellering, R.C. Jr, Gilmore, M.S. 2007. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. PLoS One 2, 7 e582.

McCallum, N., Berger-Bächi, B., Senn, M.M., 2010. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. International Journal of Medical Microbiology 300, 118–129.

McDonnell, G., Russell, A.D. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev 12, 147-179.

McMurry, L.M., McDermott, P.F., Levy, S.B. 1999. Genetic evidence that *InhA* of *Mycobacterium smegmatis* is a target for triclosan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43, 711-713.

Magnet, S., Courvalin, P., Lambert, T. 2001. Resistance- Nodulation- Cell-Division- Type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45, 3375- 3380

Meer, R.R., Baker, J., Bodyfelt, F.W., Griffiths, M.W. 1991. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: A Review. Journal of Food Protection 54, 969–979.

Meyer, E., Lunke, C., Kist, M., Schwab, F., Frank, U., 2008. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from food, animals and humans in Germany. Infection 36, 59–61.

- Miall, S.H., Walker, I.O. 1966. Structural studies on ribosomes I. The binding of proflavine to *Escherichia coli* ribosomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 145, 82-95.
- Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., Helmuth, R. 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56,1025–1033.
- Miles, T.D., McLaughlin, W., Brown, P.D., 2006. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. *BMC Veterinary Research* 2, 7.
- Miller, III.A., Scanlan, R.A., Lee, J.S., Libbey, L.M. 1993. Identification of volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas fragi*. *Applied Microbiology* 25, 952- 955
- Mitchell, B.A., Brown, M.H., Skurray, R.A. 1998. QacA Multidrug Efflux Pump from *Staphylococcus aureus*: Comparative Analysis of Resistance to Diamidines, Biguanidines, and Guanyldihydrazones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42, 475-477.
- Molin, G., Ternstrom, A. 1986. Phenotypically based taxonomy of psychrotrophic *Pseudomonas* isolated from spoiled meat, water and soil. *International Journal of Systematic Bacteriology* 588 (36),257-274
- Molina, J., Cordero, E., Palomino, J., Pachón, J. 2009. Aminoglucosidos y polimixinas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 27.
- Morot-Bizot, S.C., Talon, R., Leroy, S., 2004. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1087–1094.
- Mosher, R.H., Ranade, N.P., Schremppf, H., Vining, L.C. 1990. Chloramphenicol resistance in *Streptomyces*: cloning and characterization of a hydrolase gene from *Streptomyces venezuelae*. *Journal of General Microbiology* 136, 293- 301.
- Mosher, R.H., Camp, D.J., Yang, K., Brown, M.P., Shaw, W.V., Vining, L.C. 1995. Inactivation of chloramphenicol by O- phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 270, 27000- 27006.
- Munsch-Alatossava, P., Alatossava, T., 2007. Antibiotic resistance of raw milk associated psychrotrophic bacteria. *Microbiological Research* 162, 115–123.
- Murray, B.E. 1990. The life and times of the Enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews* 3,46–65.
- Murray, B.E., 1997. Vancomycin -resistant enterococci. *The American Journal of Medicine* 101, 284- 293.
- Murray, B.E., 2000. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *The New England Journal of Medicine* 342, 710- 721.

- Nakamura, K., Tamaoki, T. 1968. Reversible dissociation of *Escherichia coli* ribosomes by hydrogen peroxide. *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis* 161, 368-376.
- Naser, S.M., Thompson, F.L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., Swings, J., 2005. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology* 151, 2141- 2150.
- Neskovic, A. 2008. Characterization of Coagulase Positive Staphylococci from Pig Carcasses from Swedish Slaughterhouses. Tesis doctoral, Universidad de Uppsala.
- Nester, E.W., Anderson, D.G., Roberts Jr., C.E., Nester, M.T., 2007. *Microbiology: a Human Perspective*, fifth ed. McGraw, Boston.
- Newton, K.G., Harrison, J.C.L., Wauters, A.M. 2008. Sources of Psychrotrophic Bacteria on Meat at the Abattoir. *Journal of Applied Bacteriology* . 45,75-82.
- Ng, L-K., Martin, I., Alfo, M., Mulvey, M. 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistance genes. *Molecular and Cellular Probes* 15,209–215.
- Nguyen-the C, Carlin, F. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34,371–401.
- Nielsen, D.S., Cho, G-S., Hanak, A., Huch, M., Franz, C.M.A.P., Arneborg, N. 2010. The effect of bacteriocin- producing *Lactobacillus plantarum* strains on the intracellular pH of sessile and planktonic *Listeria monocytogenes* single cells. *International Journal of Food Microbiology* 141, S53- S59.
- Nikaido, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science* 264,382-388.
- Nikaido, H. 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*. 178, 5853- 5859.
- Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Parisi, A., Santagada, G., Firinu, A., Crisetti, E., Celano, G.V. 2007. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 115, 290- 296.
- Ogase, H., Nagai, I., Kameda, K., Kume, S., Ono, S. 1992. Identification and quantitative analysis of degradation products of chlorhexidine with chlorhexidine-resistant bacteria with three-dimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Applied Bacteriology* 73, 71-78.

- Oh, H., Stenhoff, J., Jalal, S., Wretling, B. 2003. Role of Efflux Pumps and Mutations in Genes for Topoisomerases II and IV in Fluoroquinolone-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *Microbial Drug Resistance* 9,323-328.
- Okamoto, S., Suzuki, Y. 1965. Chloramphenicol dihydrostreptomycin and kanamycin inactivating enzymes from multiple drug resistant *Escherichia coli* carrying episome R. *Nature* 208, 1301.
- Ordóñez, J.A., Cambero, M.I., fernández, L., García, M.L., García de fernando, G., de la Hoz, L., Selgas, M.D., (Eds.) 1998. Alimentos de origen animal, Vol. 2. Editorial Síntesis, S. A., Madrid.
- Ortega- Morente, E., Fernandez-Fuentes, M.A., Grande Burgos, M.J., Abriouel, H., Perez Pulido, R., Galvez, A. 2013. Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 162, 13-25.
- Padungtod, P., Kaneene, J.B., Hanson, R., Morita, Y., Boonmar, S., 2006. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolated from food animals and humans in northern Thailand. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 47, 217–225.
- Pagés, J.-M., Amaral, L., 2009. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1794, 826- 833.
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J.R. 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiology Reviews*. 33,757–784.
- Paulsen, I.T., Firth, N., Skurray, R.A. 1997. Resistance to antimicrobials agents other than b- lactams. Churchill Livingston Inc., New York.
- Paulsen, I.T., Littlejohn, T.G., Radstrom, P., Sundstrom, L., Skold, O., Swedberg, G., Skurray, R.A. 1993. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemotherapy*. 37, 761- 768.
- Peel, T., Cheng, A.C., Spelman, T., Huysmans, M., Spelman, D., 2011. Differing risk factors for vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococcal bacteraemia. *Clinical Microbiology and Infection* 18, 388- 394.
- Pei, R., Kim, S.-C., Carlson, K.H., Pruden, A. 2006. Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Research* 40,2427-2435.
- Peng, J.S., Tsai, W.C., Chou, C.C. 2002. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International Journal of Food Microbiology* 77, 11-18.

- Pepper, K., Le- Bouguénec, C., de- Cespédès, G., Horaud, T. 1986. Dispersal of a plasmid-borne chloramphenicol-resistance gene in streptococcal and enterococcal plasmids. *Plasmid* 16, 195–203.
- Pérez-Pulido, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martínez- Cañamero, M., Gálvez, A. 2006. Safety and potential risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food Chem Toxicol* 44,2070–2077.
- Peters, J., Mac, K., Wichmann-Schauer, H., Klein, G., Ellerbroek, L. 2003. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International Journal of Food Microbiology* 88,311–314.
- Peyrat, M.B., Soumet, C., Maris, P., Sanders, P., 2008. Phenotypes and genotypes of campylobacter strains isolated after cleaning and disinfection in poultry slaughterhouses. *Veterinary Microbiology* 128, 313–326.
- Ploy, M.C., Denis, F., Courvalin, P., Lambert, T. 2000. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of an hybrid class 2 integron. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44,2684-2688.
- Pociecha, J.R., Smith, K.R., Manderson, G.J. 1991. Incidence of *Listeria monocytogenes* in meat production environments of a South Island (New Zealand) mutton slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology* 13, 321- 327.
- Poh, C.H., Oh, H.M.L., Tan, A.L., 2006. Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteraemia in an acute care hospital. *J. Infect.* 52, 383- 386.
- Poirel, L., Cattoir, V., Nordmann, P. 2012. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Poole, K. 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology* 92, 55S-64S.
- Poole, K., 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56, 20- 51.
- Poole, K. 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med.* 39, 162- 176.
- Poole, K., Lomovskaya, O., 2006. Can efflux inhibitors really counter resistance? *The Journal of Infectious Diseases* 3, 145- 152.
- Poole, K., Krebes, K., McNally, C., Neshat, S. 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *Journal of Bacteriology* 175, 7363-7372.
- Portillo, A., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Alonso, A., Martinez, J.L., Torres, C. 2000. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44,967–971.

Prasad, G., Minakshi. 2007. *In Immunology and Medical Microbiology*, p 1-23. Normal microbial flora of human body and host parasite relationship. National Science Digital Library.

Putman, M., van Veen, H.W., Konings, W.N., 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 672-693.

Radstrom, P., Swedberg, G., Skold, O. 1991. Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in gram- negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35,1840-1848.

Ramírez, M.S., Tomalsky, M.E. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13, 151- 171.

Randall, L.P., Cooles, S.W., Coldham, N.G., Penuela, E.G., Mott, A.C., Woodward, M.J., Piddock, L.J., Webber, M.A. 2007. Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60, 1273-1280.

Reddy, M.C., Bills, D.D., Lindsey, R.C., Libbey, L.M. 1968. Ester production by *Pseudomonas fragi*. I. Identification and quantification of some esters produced in milk cultures. *J. Dairy Sci.* 51,656–659.

Reglamento (CE) nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.

Reglamento (CE) nº 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal.

Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios.

Reglamento (UE) nº 528/2012 del Parlamento europeo y del Consejo de 22 de mayo de 2012 relativo a la comercialización y el uso de los biocidas.

Reverdy, M.E. 1995. Les ammonium quaternaires. In: Fleurette, J., Freney, J., Reverdy, M.E. (Eds.), *Antisepsie et Désinfection*. Editions ESKA, Paris, pp. 174–198.

Reynolds, J.E.F. 1996. Martindale: The Extra Pharmacopoeia, The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London, 31th ed., pp. 1124–1126.

Ridgway, H.F., Safarik, J. 1990. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*. 56,3565-3575

- Riva, M., Franzetti, L., Galli, A. 2001. Microbiological quality of shelf-life modelling of ready to eat cicorino. *Journal of Food Protection*. 64, 228-234.
- Roberts, R.R., Hota, B., Ahmad, I., Scott, R.D. 2nd, Foster, S.D., Abbasi, F., Schabowski, S., Kampe, L.M., Ciavarella, G.G., Supino, M., Naples, J., Cordell, R., Levy, S.B., Weinstein, R.A. 2009. Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: Implications for antibiotic stewardship. *Clinical Infectious Diseases* 49,1175–1184.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C.H., Bush, K., Hooper, D.C. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 12, 83- 88.
- Rodriguez-Martinez, J.M., Cano, M.E., Velasco, C., Martinez-Martinez, L., Pascual, A. 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *Journal of Infection and Chemotherapy* 17, 149- 182.
- Romanova, N.A., Gawande, P.V., Brovko, L.Y., Griffiths, M.W., 2007. Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 71, 231–237.
- Ruiz, E., Saenz, Y., Zarazaga, M., Rocha-Gracia, R., Martinez-Martinez, L., Arlet, G., Torres, C. 2012 a. qnr, aac(6')-Ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* . 67, 886- 897.
- Ruiz, J., Pons, M.J., Gomes, C. 2012 b. Transferable mechanisms of quinolone resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 40, 196- 203.
- Russell, A.D. 1990. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. *Clinical Microbiology Reviews* 3, 99- 119.
- Russell, A.D. 1992. Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. In: Russell, A.D.H., W.B.; Ayliff, G.A.J., (Ed.), *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization.*, 2nd ed. Oxford: Blakwell Science. 89- 113.
- Russell, A.D. 1995. Mechanisms of bacterial resistance to biocides. *International Biodeterioration and Biodegradation* 36, 247-265.
- Russell, A.D. 1997. Plasmids and bacterial resistance to biocides. *Journal of Applied Microbiology* . 83, 155- 165.
- Russell, A.D. 1999. Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. In: Russell, A.D.H., W.B.; Ayliff, G.A.J., (Ed.), *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization.*, 3th ed. Oxford: Blakwell Science.
- Russell, A.D., 2000. Do biocides select for antibiotic resistant bacteria? *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 52, 227–233.



- Russell, A.D., 2002. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 92, 121s–135s.
- Russell, A.D., Chopra, I., 1996. *Understanding Antibacterial Action and Resistance*, segunda edición. Ellis Horwood, UK.
- Russell, A.D., Furr, J.R., 1977. Antibacterial activity of a new chloroxylenol preparation containing ethylenediamine tetra acetic acid. *Journal of Applied Bacteriology* . 43, 253- 260.
- Russell, A.D., Maillard, J. 2000. Response. *American Journal of Infection Control* 28, 204- 206.
- Russell, A.D., McDonnell, G., 2000. Concentration: a major factor in studying biocidal action. *The Journal of Hospital Infection* 44, 1–3.
- Russell, A.D., Furr, J.R., Maillard, J.Y. 1997. Microbial susceptibility and resistance to biocides: an understanding. *ASM News* 63, 481- 487.
- Russell, A.D., Tattawasart, U., Mailard, J.Y., Furr, J.R., 1998. Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42, 2151.
- Rybkin, T., Mainardi, J.L., Sougakoff, W., Collatz, E., Gutmann, L., 1998. Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of  $\beta$ -lactam resistance. *Journal of Infectious Diseases* 178, 159- 163.
- Safdar, N., Maki, D.G., 2002. The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, gram-negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. *Annals of Internal Medicine* 136, 834–844.
- Saïde-Albornoz, J.J., Knipe, C.L., Murano, E.A., Beran, G.W. 1995. Contamination of pork carcasses during slaughter, fabrication and chilled storage. *Journal of Food Protection* 58,993-997.
- Salt, W.G., Wiseman, D. 1970. The relation between the uptake of cetyltrimethylammonium bromide by *Escherichia coli* and its effects on cell/growth and viability. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 22, 261-264
- Salton, M.R. 1951. The adsorption of cetyltrimethylammonium bromide by bacteria, its action in releasing cellular constituents and its bactericidal effects. *Journal of General Microbiology*. 5, 391- 404.
- Salton, M.R. 1968. Lytic agents, cell permeability, and monolayer penetrability. *The Journal of General Physiology* 52, 227- 252.
- Sathish, S., Swaminathan, K., 2008. Veterinary anaerobes & diseases molecular characterization of the diversity of *Clostridium chauvoei* isolates collected

from two bovine slaughterhouses: analysis of cross-contamination. *Anaerobe* 14, 190–199.

SCAN, 1996. Report of the Scientific Committee for Animal Nutrition (SCAN) on the possible risk for humans on the use of avoparcin as feed additive. Opinion expressed 21 May 1996. Office for EC Publications, Luxembourg.

SCAN, 1998. Opinion of the Scientific Committee for Animal Nutrition (SCAN) on the immediate and long-term risk to the value of streptogramins in human medicine posed by the use of virginiamycin as an animal growth promoter. Office for EC Publications, Luxembourg . (10 July 1998).

SCENIHR. 2009. Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides. Scientific Committee on Emerging and newly Identified health Risks; European Commission.

Schjørring, S., Krogfelt, K. 2011. Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. *International Journal of Microbiology*. 312956.

Schwaiger, K., Huther, S., Hölzel, C., Kämpf, P., Bauer, J. 2012. Prevalence of antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from chicken and pork meat purchased at the slaughterhouse and at retail in Bavaria, Germany. *International Journal of Food Microbiology* . 154,206-211.

Schwarz, F.W., Perreten, V., Teuber, M. 2001. Sequence of the 50-kb conjugative multiresistance plasmid pRE25 from *Enterococcus faecalis* RE25. *Plasmid* 46,170–187.

Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., Cloeckaert, A. 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS in Microbiology Reviews* 28, 519, 542.

Seelinger, H.P.R, Jones, D. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, octava edición, ed Baltimore Williams y Wikins.

Seidavi, A., Mirhosseini, Seyed Ziaeddin, Shivazad, M., Chamani, M., Asghar Sadeghi, A., Pourseify, R., 2010. Detection and investigation of *Escherichia coli* in contents of duodenum, jejunum, ileum and cecum of broilers at different ages by PCR. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 18, 321–326.

Seija, V., Vignoli, R. 2006. Tema 35, Principales mecanismos de resistencia antibiótica., Universidad de la República- Facultad de medicina. .

Shaw, J.H., Clewell, D.B. 1985. Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* 164,782–796.

Shaker, L.A., Russell, A.D., Furr, J.R. 1986. Aspects of the action of chlorhexidine on bacterial spores. *International Journal of Pharmaceutics* 34, 51-56.

- Shepard, B.D., Gilmore, M.S. 2002. Antibiotic-resistant enterococci: The mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection* 4,215–224.
- Sidhu, M.S., Langsrud, S., Holck, A., 2001. Disinfectant and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from the food industry. *Microbial Drug Resistance* 7, 73–83.
- Sidhu, M.S., Heir, E., Leegaard, T., Wiger, K., Holck, A., 2002. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 2797–2803.
- Singh, A.K., Ramesh, A., 2008. Succession of dominant and antagonistic lactic acid bacteria in fermented cucumber: insights from a PCR-based approach. *Food Microbiology* 25, 278–287.
- Sivaraman, S., Zwahlen, J., Bell, A.F., Hedstrom, L., Tonge, P.J. 2003. Structure-activity studies of the inhibition of FabI, the enoyl reductase from *Escherichia coli*, by triclosan: kinetic analysis of mutant FabIs. *Biochemistry* 42, 4406-4413.
- Skočková, A., Cupáková, S., Karpíšková, R., Janštová, B. 2012. Detection of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* from raw cow's milk. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 1,777-784.
- Skold, O. 2001. Resistance to trimethoprin and sulfonamides. *Veterinary Research* 32, 261- 273.
- Smith, T.C., Gebreyes, W.A., Abley, M.J., Harper, A.L., Forshey, B.M., Male, M.J., Martin, H.W., Molla, B.Z., Sreevatsan, S., Thakur, S., Thiruvengadam, M., Davies, P.R. 2013. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs and Farm Workers on Conventional and Antibiotic-Free Swine Farms in the USA. *PLOS ONE* 8 - 63704.
- Spanu, V., Spanu, C., Viridis, S., Cossu, F., Scarano, C., De Santis, E.P. 2012. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 153, 53- 57.
- Spiliopoulou, I., Petinaki, E., Papandreou, P., Dimitracopoulos, G. 2004. erm(C) is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53,814-817.
- Stanbridge, L.H., Davies, A.R. 1998. The microbiology of chill-stored meat, p 175- 177. *In* Davies A, Board R (ed), *Microbiology of meat and poultry*. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom.

- Stecher, B., Denzler, R., Maier, L., Bernet, F., Sanders, M.J., Pickard, J.D., Barthel, M., Westendorf, A.M., Krogfelt, K.A., Walker, A.W., Ackermann, M., Dobrindt, U., Thomson, N.R., Hardt, W.D. 2012. Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 1269–1274.
- Stickler, D.J. 2004. Intrinsic resistance of Gram-negative bacteria., Vol. 4th. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36,1–29.
- Sustacková, A., Napravnikova, E., Schlegelova, J. 2004. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolates from raw beef and meat products. *Folia Microbiologica* 49,411–417.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Robicsek, A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 22, 664- 689.
- Sundheim, G., Hagtvedt, T., Dainty, R., 1992. Resistance of meat associated staphylococci to a quarternary ammonium compound. *Food Microbiology* 9, 161–167.
- Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., Wondrack, L. 1996. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40,2562–2566.
- Svanborg, C., Godaly, G., 1997. Bacterial virulence in urinary tract infection. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 11, 513- 529.
- Swick, M.C., Morgan-Linnell, S.K., Carlson, K.M., Zechiedrich, L. 2011. Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55,921–924.
- Szita, G., Biró, G., 1986. A new synthetic, selective, liquid medium for determination of coliform bacteria. *Acta Veterinaria Hungarica* 34, 145–149.
- Tadesse, D.A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M.J., McDermott, P.F. 2012. Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food Animals, United States, 1950–2002. *Emerging Infectious Diseases*. 18,741-749.
- Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S., Shankar, N., 2006. Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* 188, 2063- 2072.
- Terleckyj, B., Elsinger, E.C., Axler, D.A. 1995. Antiseptics and disinfectants. Current issues. *Journal of the American Podiatric Medical Association* 85, 439- 445.

- Ternstrom, A., Lindberg, A.M., Molin, G. 1993. Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. *Journal of Applied Bacteriology* . 75,25–34.
- Teuber, M., 1999. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56, 755–763.
- Teuber, M., Meile, L., Schwarz, F. 1997. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Anton van Leeuwenhoek* 76,115–137.
- Teuber, M., Schwarz, F., Perreten, V. 2003. Molecular structure and evolution of the conjugative multiresistance plasmid pRE25 of *Enterococcus faecalis* isolated from a raw fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology* 88,325–329.
- Thomas, B., Stickler, D.J. 1979. Chlorhexidine resistance and the lipids of *Providencia stuartii*. *Microbios* 24, 141-150.
- Thomas, L., Maillard, J.Y., Lambert, R.J.W., Russell, A.D., 2000. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a 'residual' concentration. *The Journal of Hospital Infection* 46, 297–303.
- Threlfall, E.J., Ward, L.R., Frost, J.A., Willshaw, G.A., 2000. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 62, 1–5.
- Threlfall, E.J., Teale, C.J., Davies, R.H., Ward, L.R., Skinner, J.A., Graham, A., Cassar, C., Speed, K., 2003. A comparison of antimicrobial susceptibilities in nontyphoidal salmonellas from humans and food animals in England and Wales in 2000. *Microbial Drug Resistance* 9, 183–189.
- Toca, M.R.F. 1998. Identificación de riesgos en incidencias de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. durante la producción de carne de pollo. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Toomey, N., Bolton, D., Fanning, S. 2010. Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Res Microbiol* 161,127–135.
- Tribuddharat, C., Fennewald, M. 1999. Integron-Mediated Rifampin Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43,960–962.
- Trivedi, K., Cupakova, S., Karpiskova, R. 2011. Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Vet Med* 56,352–357.
- Trobos, M., Jakobsen, L., Olsen, K.E., Frimodt-Moller, N., Hammerum, A.M., Pedersen, K., Agerso, Y., Porsbo, L.J., Olsen, J.E. 2008. Prevalence of sulphonamide resistance and class 1 integron genes in *Escherichia coli* isolates obtained from broilers, broiler meat, healthy humans and urinary infections in Denmark. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 32,367–369.

Tryfinopoulou, P., Tsakalidon, E., Nychas, G.JE. 2002. Characterization of *Pseudomonas* sp. associated with spoilage of Gilt-head sea bream stored under various conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 68,65-72.

Tsola, E., Drosinos, E.H., Zoiopoulos, P. 2008. Impact of poultry slaughter house modernisation and updating of food safety management systems on the microbiological quality and safety of products. *Food Control* 19,423-431.

Valenzuela, A.S., Omar, N.B., Abriouel, H., López, R.L., Ortega, E., Cañamero, M.M., Gálvez, A. 2008. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: Determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food and Chemical Toxicology* 46 ,2648–2652.

Valenzuela, A.S., Benomar, N., Abriouel, H., Cañamero, M.M., Gálvez, A. 2010. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin- like substances. *Food Microbiology* 27,955–961.

Valenzuela, A.S., Lavilla- Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A., Pérez Pulido, R., Abriouel, H., 2013. Phenotypic and molecular antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from different traditional fermented foods. *Foodborne Pathogens and Disease* 10, 143- 149.

Van de Weyer, A., Devleeschouwer, M.J., Dony, J., 1993. Bactericidal activity of disinfectants on *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology* 74, 480–483.

Van den Bogaard, A., London, N., Driessen, C., Stobberingh, E. 2001. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 47,763–771.

Van Hoek, A.H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J. 2001. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology* 2, 203.

Vankerckhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., Goossens, H. 2004. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology* 42,4473–4479.

Vankerckhoven, V., Huys, G., Vancanneyt, M., Snauwaert, C., Swings, J., Klare, I., Witte, W., Van Autgaerden, T., Chapelle, S., Lammens, C., Goossens, H., 2008. Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 4247- 4255.

- Vergis, E.N., Hayden, M.K., Chow, J.W., Snyderman, D.R., Zervos, M.J., Linden, P.K., Wagener, M.M., Schmitt, B., Muder, R.R., 2001. Determinants of vancomycin resistance and mortality rates in enterococcal bacteremia. *Annals of Internal Medicine* 135, 484- 492.
- Verraes, C., Van Boxtael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., de Schaetzen, M.-A.n.s., Van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J., Herman, L. 2013. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10, 2643-2669.
- Vignaroli, C., Zandri, G., Aquilanti, L., Pasquaroli, S., Biavasco, F. 2011. Multidrug-resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. *Current Microbiology* 62,1438– 1447.
- Volkman, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S., Obst, U., 2004. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *Journal of Microbiological Methods* 56, 277–286.
- Walker, S.J., Archer, P., Banks, J.G. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Microbiology* 68, 157- 162.
- Walsh, S.E., Maillard, J.Y., Russell, A.D., Hann, A.C. 2001. Possible mechanisms for the relative efficacies of ortho-phthalaldehyde and glutaraldehyde against glutaraldehyde-resistant *Mycobacterium chelonae*. *Journal of Applied Microbiology* . 91, 80- 92.
- Wang, H.H., Manuzon, M., Lehman, M., Wan, K., Luo, H.L., Wittum, T.E., Yousef, A., Bakaletz, L.O. 2006. Food comensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* 254,226–231.
- Wang, J.H., Matheson, A.T. 1967. The possible role of sulphhydryl groups in the dimerization of 70S ribosomes from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 23, 740-744.
- Warren, R.E., Ensor, V.M., O'Neill, P., Butler, V., Taylor, J., Nye, K., Harvey, M., Livermore, D.M., Woodford, N., Hawkey. P.M. 2008. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61,504-508
- Waskaman, S.A. 1943. Production and activity of streptomycin. *Journal of Bacteriology* 46, 299- 310

- Wassenberg, M.W., de Wit, G.A., van Hout, B.A., Bonten, M.J. 2010. Quantifying cost-effectiveness of controlling nosocomial spread of antibiotic-resistant bacteria: The case of MRSA. PLoS One 5,e11562.
- Webber, M.A., Randall, L.P., Cooles, S., Woodward, M.J., Piddock, L.J.V. 2008. Triclosan resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 62, 83-91.
- Wegener, H.C. 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. Current Opinion in Microbiology . 6, 439–445.
- Wei, H.L., Chiou, C.S. 2002. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. Epidemiology and Infection 128 (1), 15-20.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173, 697–703.
- Werner, G., Hildebrandt, B., Klare, I., Witte, W. 2000. Linkage of determinants for streptogramin A, macrolide-lincosamide-streptogramin B, and chloramphenicol resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium* and dissemination of this cluster among streptogramin-resistant enterococci. International Journal of Medical Microbiology 290,543–548.
- White, D.G., Zhao, S., Simjee, S., Wagner, D.D., McDermott, P.F., 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. Microbes and Infection 4, 405–412.
- White, P.A., McIver, C.J., Deng, Y.M., Rawlinson, W.D. 2000. Characterisation of two new gene cassettes, *aadA5* and *dfra17*. FEMS Microbiology Letters 182,265-269.
- WHO. 2012. The evolving threat of antimicrobial resistance. Options for action. World Health Organization, Switzerland.
- WHO. 2014. Antimicrobial Resistance: Global Report on surveillance. WHO Press, Geneva- Switzerland.
- Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S.S., Ralyea, R.M., Boor, K.J. 2000. Molecular and Phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. Applied and Environmental Microbiology. 66,2085-2095.
- Wilcks, A., Andersen, S.R., Licht, T.R. 2005. Characterization of transferable tetracycline resistance genes in *Enterococcus faecalis* isolated from food. FEMS Microbiology Letters 243,15–19.
- Witte, W. 2000a. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: Environment. International Journal of Antimicrobial Agents 14,321–325.



- Witte, W., 2000b. Selective pressure by antibiotic use in livestock. *International Journal of Antimicrobial Agents* 16, S19- S24.
- Wright, N.E., Gilbert, P. 1987. Antimicrobial activity of n-alkyltrimethylammonium bromides: influence of specific growth rate and nutrient limitation *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* . 39, 658- 690.
- Yadav, J.S., Khan, I.U.H., Fakhari, F., Soellner, M.B., 2003. DNA-based methodologies for rapid detection, quantification, and species- or strain-level identification of respiratory pathogens (*Mycobacteria* and *Pseudomonads*) in metalworking fluids. *Applied Occupational and Environmental Hygiene* 18, 966–975.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A., Harayama, S. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146,2385–94
- Yerushalmi, H., Lebendiker, M., Schuldiner, S. 1995. EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H<sup>+</sup> and is soluble in organic solvents. *Journal of Biological Chemistry* 270, 6856-6863.
- Zgurskaya, H.I., Nikaido, H. 2000. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Molecular Microbiology* . 37,219-25
- Zhang, H., Herman, J.P., Bolton, H., Zhang, Z., Clark, S., Xun, L., 2007. Evidence that bacterial ABC-type transporter imports free EDTA for metabolism. *Journal of Bacteriology* 189, 7991- 7997.
- Zhang, X.X., Zhang, T. 2011. Occurrence, abundance, and diversity of tetracycline resistance genes in 15 sewage treatment plants across China and other global locations. *Environmental Science and Technology* 45, 2598- 2604
- Zhang, X.Y., Ding, L.J., Yue, J. 2009. Occurrence and characteristics of class 1 and class 2 integrons in resistant *Escherichia coli* isolates from animals and farm workers in Northeastern China. *Microbial Drug Resistance* 15,323-328.
- Zhu, Y.G., Johnson, T.A., Su, J.Q., Qiao, M., Guo, G.X., Stedtfeld, R.D., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M. 2013. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Zinner, S.H., Mayer, K.H. 2000. Sulphonamide and trimethoprin. *Principles and practice of infectious disease*, 5<sup>o</sup> edicion.